



**Dpto. Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**Estudio estructural y funcional de
genes candidatos, alternativos al
PRNP, como posibles moduladores
de la respuesta a *scrapie* en ovino**

*Structural and functional study of candidate genes, different
from the PRNP, as possible modifiers of the response to
scrapie in sheep*

**Tesis Doctoral
Ane Marcos Carcavilla**

**Madrid
2007**

Dpto. Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio estructural y funcional de genes candidatos, alternativos al
PRNP, como posibles moduladores de la respuesta a *scrapie* en ovino**

Structural and functional study of candidate genes, different from the *PRNP*, as
possible modifiers of the response to *scrapie* in sheep

Memoria presentada por
Ane Marcos Carcavilla
para optar al grado de Doctor Europeus
en la Universidad Autónoma de Madrid
Madrid 2003



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y
ALIMENTARIA (INIA)

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE
INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA

DPTO. MEJORA GENÉTICA ANIMAL

M^a Magdalena Serrano Noreña, Investigadora Titular del Departamento de Mejora Genética Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Jorge Hugo Calvo Lacosta, Investigador de la Unidad de Tecnología en Producción Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA)

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada: “Estudio Estructural y Funcional de genes candidatos, alternativos al PRNP, como posibles moduladores de la respuesta a *scrapie*”, que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora Ane Marcos Carcavilla, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el periodo comprendido entre los años 2004 a 2007 en el Departamento de Mejora Genética Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), cumple todas las condiciones exigidas para que su autora pueda optar al Grado de **DOCTOR EUROPEUS** por la Universidad Autónoma de Madrid.

Lo que suscriben como directores del trabajo, en Madrid a seis de noviembre de 2007.

Fdo.: M^a Magdalena Serrano Noreña

Fdo.: Jorge Hugo Calvo Lacosta

CORREO ELECTRÓNICO:

secmgb@inia.es

Ctra. de La Coruña, Km. 7,5
28040 MADRID
TEL: 91 347 67 41
FAX: 91 357 22 93



Institut National de la Recherche Agronomique

Edmond-Paul Cribiu

*Laboratoire de Génétique biochimique
et de Cytogénétique*

INRA – CRJ

78350 Jouy-en-Josas

☎ 01 34 65 25 70

☎ 01 34 65 24 78

edmond-Paul.Cribiu@jouy.inra.fr

January 3th, 2006,

To whom it may concern,

As director of the laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique at INRA-CRJ, Jouy-en-Josas, Edmond-Paul Cribiu, I certify that Ane Marcos Carcavilla, PhD student from the departamento de Mejora genética Animal-INIA, Madrid (Spain) has followed a training in fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques during a period of 3 months, from October 1 to the end of December 2005. The aim of her work was to isolate several genomic clones of various ovine genes, presumed to be involved in resistance/susceptibility to scrapie disease in sheep. Towards this purpose she screened the INRA sheep BAC library to perform the physical mapping of the genes using FISH.

Edmond-Paul Cribiu

Concerning

Expert evaluation doctoral thesis Ane Marcos Carcavilla

Date

31/10/2007

Contact

Prof. Dr. Luc Peelman

E-mail

Luc.Peelman@UGent.be

Tel. & fax

T +32 9 264 78 03

F +32 9 264 78 49

As a professor in the Animal Genetics Laboratory at Ghent University (Belgium), I give my expert opinion on the doctoral thesis entitled “Estudio Estructural y Funcional de genes candidatos, alternativos al *PRNP*, como posibles moduladores de la respuesta a Scrapie en ovino (Functional and Structural study of candidate genes, different from the *PRNP*, as possible modifiers of the response to scrapie in sheep)” by Ane Marcos Carcavilla in order to obtain the degree of Doctor Europeus.

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative diseases caused by transmissible proteinaceous particles (prions) devoid of nucleic acid that affect man and various animals. The key event in the pathogenesis of prion diseases is the conversion of the host encoded and naturally expressed cellular prion protein (PrP^{C}), encoded by the *PRNP* gene, into its aberrant counterpart PrP^{Sc} . Susceptibility to scrapie, a TSE in sheep and goat, is mainly controlled by point mutations at the *PRNP* locus. However, there is sufficient scientific evidence to hypothesize that other genes, apart from *PRNP*, modulate susceptibility to scrapie. The characterization of four putative positional and/or functional candidate genes that might be involved in the polygenic variance of scrapie susceptibility in sheep was started in this thesis, including *IL1B* and *IL1RN* (localised inflammatory response which could contribute to exacerbate cellular damage), *HSP90AA1* (localised inflammatory response which could contribute to exacerbate cellular damage, and cellular response against abnormal prion accumulation), and *RPSA* (cellular entrance and propagation of PrP^{Sc}).

Ovine *IL1B* and *IL1RN* were partially isolated and characterised, including promoter and other regulatory regions. In addition, several sequence polymorphisms were identified. Furthermore, their cytogenetic positions on sheep chromosomes were determined by FISH and confirmed by linkage analysis, localizing both genes in OAR3q22, a region previously described as carrying a Quantitative Trait Loci (QTL) for scrapie incubation period in sheep. Finally, expression analysis was carried out in eight naturally scrapie-infected sheep with the same genotype for *PRNP* (ARQ/ARQ). This comparison was performed using real-time RT-PCR in samples of spleen and cerebellum. Results showed differences in the expression of both cytokines in cerebellum ($p < 0.05$), but not in spleen ($p > 0.05$). It can be concluded that *IL1B* and *IL1RN* are good positional and functional candidate genes that modulate the scrapie incubation period in sheep. Thus, any cause leading to an up- or downregulation of IL-1beta activity could influence the onset of the clinical stage of the disease by interfering with the neurodegenerative process. The identified polymorphisms might be useful to assess linkage to scrapie susceptibility and/or the incubation time in the future. All this work resulted in a published manuscript entitled “IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localisation, partial characterization, and expression” in *Mammalian Genome* 18, 53-63 (2007) by Ane Marcos-Carcavilla et al.

Ovine *HSP90AA1* gene including the promoter and other regulatory regions has been isolated and characterized. Several sequence polymorphisms have also been identified. FISH mapping localized the *HSP90AA1* gene on ovine chromosome OAR19q24dist, which was confirmed by linkage analysis. This chromosome region has been shown to include a QTL for scrapie incubation period in sheep. Expression analyses were carried out in spleen and cerebellum samples. No differences in the expression of the *HSP90AA1* gene were found in any of these tissues ($p > 0.05$) between control and infected animal samples. Nevertheless, association analyses revealed that several polymorphisms in the 5' and 3' regions of the *HSP90AA1* gene were differentially distributed among animals with different responses to scrapie infection. These results support the hypothesis that *HSP90AA1* could be a positional and functional candidate gene modulating the response to scrapie in sheep. Nevertheless further analyses should be performed in order to see if there are any differences in Hsp90α expression that could be explained by the described polymorphisms, and to test if combinations of the alleles described for the *HSP90AA1* 5' flanking region and intron 10 can interact to modulate the response to scrapie in sheep. All this work resulted in an accepted manuscript entitled “Structural and functional analysis of the *HSP90AA1* gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie” in *Cell Stress and Chaperones* by Ane Marcos-Carcavilla et al.

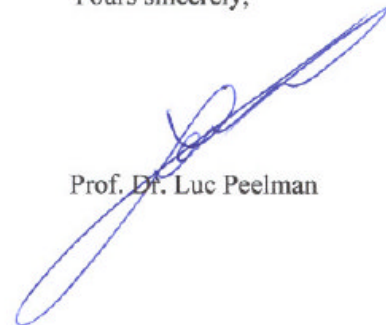


Ovine *RPSA* was isolated, characterized and mapped to ovine chromosome OAR19q13. Real time RT-PCR revealed a significant decrease in *RPSA* mRNA in cerebellum after scrapie infection. Conversely, no differences were detected in other brain regions such as diencephalon and medulla oblongata. Association analysis showed that a polymorphism, reflecting the presence of a *RPSA* pseudogene, is over-represented in a group of sheep resistant to scrapie infection. No amino acid change in the LRP/LR protein was found in the 126 sheep analysed. However, interesting amino acid positions, which could participate in the species barrier to SC and maybe other TSEs, were identified by comparing LRP/LR sequences from various mammals with variable levels of resistance to scrapie. It was suggested that it may be the presence of a *RPSA* pseudogene, and not variation in the ovine LRP/LR amino acid sequence, which explains the susceptibility differences to SC among sheep with the same *PRNP* genotype. However, the possible involvement of this receptor in the species barrier to scrapie and other TSEs should not be discarded. Further studies are required to examine the existence of polymorphisms at regions affecting the gene and protein regulation and processing, and the possible involvement of ovine *RPSA* pseudogenes in the incubation period to scrapie in sheep. All this work resulted in an accepted manuscript entitled "Structural and functional analysis of the ovine *RPSA* gene. Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response" in Mammalian Genome by Ane Marcos-Carcavilla et al.

In conclusion, it is my opinion that these results, which should be a basis for further interesting research, are properly written and discussed with a critical open mind in international journals. Therefore, I believe that Ane Marcos Carcavilla has proved to be a good scientist and is an obvious candidate for obtaining the degree of Doctor Europeus with this doctoral thesis.

Yours sincerely,

Prof. Dr. Luc Peelman





Semmelweis University
Department of Medical Chemistry
H-1444 Budapest, P.O.Box 260.
<http://www.linkgroup.hu>
email: csermely@puskin.sote.hu

Report on Ms. Ane Marcos-Carcavilla's Ph.D. thesis

It is my great pleasure to review the scientific content and work of Ms. Marcos' Ph.D. thesis. The subject of the study is of great importance. The understanding of the mechanisms used by prions to enter in, and propagate through the organism constitutes a key factor for the development of control programs and new therapies against related neurodegenerative diseases. On the other hand, molecular chaperones are proteins, which are central in the everyday life of the cells and have paramount importance in their defense against various environmental stresses. Recent results provided evidence that stress proteins were and are important in the sudden bursts in evolution, and the number of medical application of stress proteins is exponentially increasing. Ms. Marcos provided a substantial contribution to the advancement of our understanding of the genes contributing to the regulation of prion infection and propagation in sheep.

The important **new scientific results** of Ms. Marcos are the following: She analyzed the contribution of *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN* genes to the polygenic variance associated with the different resistance/susceptibility to scrapie infection in sheep by mapping these four genes in the ovine genome and analyzing their expression changes during scrapie infection. She found that the expression of both cytokines and of the laminin receptor varies as consequence of scrapie infection. On the other hand, the association analysis revealed several SNPs affecting putative regulatory elements in *HSP90AA1* gene and a SNP which could be in linkage disequilibrium with the causal mutation in *IL1B* gene, which were associated to the different resistance/susceptibility to scrapie infection. Furthermore, the presence of a *RPSA* pseudogene was significantly overrepresented in the group of sheep that, despite being in contact with the SC agent did not develop the disease.

Ms. Marcos published three first author papers in international scientific journals related to her PhD work. The English summary of the thesis I received gives a proper background, lists the important results, and provides a thoughtful but modest discussion of the results achieved. The description of methods in the enclosed papers is detailed, the experiments are based on careful studies and controls. The reference lists adequately acknowledge the previous work of Ms. Marcos' peers in the field.

Agradecimientos

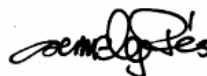
Questions:

1. Why the candidate thinks that the expression analysis performed in spleen and cerebellum covers the wide range of sheep tissues and organs as possible steps of prion propagation in this animal adequately?
2. What potential methods might be used to ascertain that a few from the 51 animals used as “healthy controls” are not, in fact, having longer incubation periods with prions than the “infected” animals?
3. Would it be possible to speculate what might be the functional role of LRP/LR, Hsp90- α , IL-1 β , and IL-1Ra proteins in prion propagation in sheep?

It would be useful, if the candidate would prepare short answers to these questions for the oral examination. None of these questions, however, cast doubt on the overall conclusions of the candidate's work, which shows evidence of critical evaluation and judgment, a good mastery of the background literature, and which is based on sound and solid experimental facts.

As a summary of my opinion on the scientific content and work of Ms. Marcos' PhD thesis I am convinced that it reflects the ability of Ms. Marcos for a high quality, independent scientific research work, provides important new advances in the field of prions and various related genes including heat shock proteins-molecular chaperones. It is my great pleasure to recommend Ms. Marcos's work for the members of the Examination Board and Senate to accept as a PhD degree.

Budapest, 4th November 2007



Peter Csermely, PhD, DSc
Professor of Biochemistry



Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione
Sezione di Neurologia Clinica
Università degli Studi di Verona

Verona, November 3th 2007

A major issue in prion disorder is to detect which are the prion partners in replication. The presence of a hypothetical "protein X" has been stated as a fundamental clue for understanding the mechanisms of prion conversion. However, the identity of this chaperone protein still remains a matter of debate.

In her Ph.D. studies, Dr. Ane Marcos focused on searching for partners distinct from PrP, acting as potential candidates for the polygenic variance associated with the different resistance/susceptibility to scrapie infection in sheep. She studied four different genes *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN*, in sheep affected or exposed to scrapie infection. She isolated and characterised *IL1B* and *IL1RN* genes and of *HSP90AA1* gene, including promoter and other regulatory regions, identifying polymorphisms. Moreover, the entire sequence of the ovine laminin receptor gene was isolated, characterized and mapped to ovine chromosome OAR19q13. These studies are original contributions, important for novelty which leads to important assumptions related to scrapie susceptibility in sheep. The experiments included in their studies are well designed, showing that Dr. Marcos have gained technical skills of high level. As a feedback, the results obtained have been published on international peer-reviewed scientific journals.

I do think that Dr. Marcos fulfils the scientific requests to be considered for a degree of Doctor Europaeus.

I attest that what above is true and valid

Yours sincerely

Dr. Gianluigi Zanusso
Department of Neurological and Visual Sciences
Section of Neurology
University of Verona,
Italy

"Es increíble lo bien que uno se siente cuando cree en lo que está haciendo y lo disfruta" (Adam J. Jackson)

A mis aitas, no tengo palabras, nada sería lo mismo sin vuestra ayuda.

A aitite, al abuelo y a la abuela, ojalá estuvierais aquí para verlo.

A amama, y a todos esos tíos, tías y demás familia que tanta fuerza me habéis dado.

A Thiago.

AGRADECIMIENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS

Desde el 2 de Febrero de 2004, día en que comenzó oficialmente mi beca predoctoral, hasta el día de hoy me ha dado tiempo a hacer un buen recorrido: desde el INRA (Jouy-en-Josas), hasta el CISA (Madrid), pasando por la Universidad de Zaragoza y el CITA (Zaragoza) y por supuesto, el departamento de Mejora Genética Animal del INIA (Madrid), en el cual he desarrollado la mayor parte de mi tesis.

Je suis reconnaissante au Dr. Edmond Cribiu pour m'avoir permis de passer quelques mois au Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique du INRA-CRJ. Là, j'appris la manière aux BACs avec Pascal Laurant (vous avez confié à moi dans les mauvais moments), et la méthodologie de FISH avec Maud Bertaud (le peu français que je parle c'est pour vous) et la Dr. Hellène Hayes (merci pour toutes les corrections en anglais) et finalement, la Dr. Katayoun Moazami-Goudarzi, qui a été toujours attentive de que tout réussisse. Merci beaucoup

Gracias a la Dr. Pilar Zaragoza y a la Dr. Inmaculada Martín-Burriel por posibilitar mi estancia en el departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Allí llevé a cabo el estudio de expresión por PCR cuantitativa y pude comprobar que no hay que temer al RNA.

Con el Dr. Juan María Torres acabé la parte experimental de esta tesis, en el laboratorio de Priones del CISA, aprendiendo técnicas básicas de biología molecular así como de manejo y visualización de proteínas. Gracias por todo el apoyo y la ayuda prestada durante estos años.

En mi paso por todos estos lugares pude conocer a muchos de vosotros, que con tanto cariño me habéis acogido haciéndome sentir como en casa: Carmina, Jaber, Arianne, Ana Cris, David, Carmen, María, Laura, Clemen, Charo mis chicas del CISA: Danielle, Aroa, Patri, Jeni, Chus, Nuria, Ana Villa, Ana Handler, Elia, Susana, Irene y especialmente a ti, Mamá Pato (Mariu) y a todos los que como tú han estado ahí desinteresadamente, dedicándome su tiempo con tanta paciencia: Malena, Jorge, Pascal, Katayoun, Maud, Helène y Carmina. Todo lo que sé os lo debo a vosotros.

During the last four years I have been up and down meeting all of you. Since I arrive from the small city of Bilbao to Madrid I found a family, with La Noe, La Niña B, Carol, Javi y Juan, and I meet all of you on the way: Angeles, Jana, Rosa, Ewa, Micaela, Borja, La Niña María, Slim, Benjamin, Julietta, Pedro, Albert, Pilar, Bea, Chus, Carlota, Loli, Alex, Eveline, Mario (thanks a million for all your help during the last months), Vincent, Horacio, Carol, Ester, Marta...

We have laughed, we have cried, but above all, we had fun. I'll never forget you.

Tampoco puedo olvidarme de mis amigos de toda la vida (Jani, Lide, Adri, Iker, Javivi...), ni de mis comienzos en el mundo de la ciencia con la Dr. Isabel Arrieta y con Merche, Olga, Bego, Cristina y Letti; gracias por ofrecerme algo tan importante como es vuestra amistad y por todo lo vivido juntos.

I would like also to thank Dr. Peter Csermely, Dr. Luc Peelman and Dr. Gianluigi Zanusso for kindly reviewing this manuscript, to Dr. Stefan Weiss, Dr. Steve Simoneau, Dr. Juan Ayala and Dr. Csaba Soti for contributing in the understanding of LRP/LR, Hsp90 and other chaperones physiology and/or structure, to Dr. Rafael Blasco for the logistic support and to Dr. Fernando Ponz, Dr. Carmen Mansilla and the future Dr. Angeles Aroca for their help with the PCRs improvement.

Y no menos por estar al final, a mis compañeros del INIA, que desde el principio hasta hoy me habéis estado apoyando y dando ánimos cuando a sido necesario, especialmente a la sección de becarios y recién-exbecarios (Juan Pablo, Jose Carlos, Natalia, Maite, Gloria, María y Amanda) y a Estefanía, Cristina, Juanjo, Alberto, Ana, Silvia, Maite, Clara y Maria Jesús. Pero sobre todo a mi Carmen de España y a mis directores de tesis: la Dr. Magdalena Serrano Noreña y el Dr. Jorge Hugo Calvo Lacosta, que no han hecho otra cosa que dedicar parte de su tiempo a animarme, ayudarme y facilitarme el trabajo. Espero poder devolveros tanto esfuerzo.

Finalmente he de dar las gracias al CERSYRA-Valdepeñas, a AGRAMA, al CSIC-León, al CITA-Aragón, al Centro de Investigación de priones de la Universidad de Zaragoza y al ETSIA-Universidad Politécnica de Madrid, por habernos proporcionado las distintas muestras utilizadas en este estudio. Especialmente al INIA, por su soporte económico con una beca predoctoral y con el proyecto RTA2006-00104

Gracias a todos por haber hecho posible este día

Thanks to all for making it possible

Antes de comenzar a leer este trabajo es importante saber que está organizado fundamentalmente en dos partes: el cuerpo del manuscrito y los anexos. La primera de ellas recoge todos los resultados obtenidos en este estudio y en ocasiones, a fin de no hacer el texto demasiado largo y repetitivo, se refiere a los artículos, que están incluidos en la segunda sección: los anexos, que incluyen todas las secuencias aisladas en este trabajo, tres artículos que resumen los resultados más relevantes (Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a, Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b, Marcos-Carcavilla *et al.* accepted) y tres posters que han sido presentados en congresos internacionales. Los apartados abreviaturas y glosario incluyen información adicional que puede ayudar a comprender mejor el texto

Before start reading this manuscript is important to know that it is organised in two main parts: the manuscript body, and the annexes. The primary compiles all the results derived from this study alluding to the articles which are included in the annexes in order not to make the text very long and repetitive. The second section, the annexes, enclose all the sequences isolated in this work, three articles which resume the more relevant results (Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a, Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b, Marcos-Carcavilla *et al.* accepted) and three posters presented in international congresses. Additionally, the abbreviations and glossary sections include some information which might help in the better comprehension of the manuscript.

RESUMEN/SUMMARY	I
ABREVIATURAS	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ENFERMEDADES PRIÓNICAS. GENERALIDADES.....	3
I.1.1. Marco histórico	3
I.1.2. Naturaleza del agente causal de las EETs.....	4
I.1.3. Importancia de las EETs para el hombre.....	4
I.1.4. La PrP ^c en la célula	5
I.1.4.1. Síntesis y localización de la PrP ^c	5
I.1.4.2. Funciones celulares de la PrP ^c	6
I.1.4.3. PrP ^c vs PrP ^{sc}	7
I.1.5. Mecanismo de conversión.....	8
I.1.5.1. Modelo del heterodímero	9
I.1.5.2. Modelo de polimerización nucleada	9
I.1.6. Barrera de especie.....	10
I.1.7. Mecanismo de propagación.....	11
I.2. DAÑO CELULAR Y NEURODEGENERACIÓN.....	12
I.2.1. Agregación de proteínas y citotoxicidad	13
I.2.2. Microglía y muerte neuronal	15
I.3. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA Y DETECCIÓN DE GENES CON EFECTO SOBRE CARACTERES CUANTITATIVOS	16
I.4. MARCADORES MOLECULARES	17
I.4.1. Análisis descriptivo de un polimorfismo.....	18
I.4.1.1. Generación de los Marcadores Moleculares	19
I.4.2. Análisis de asociación de polimorfismos con caracteres de interés.....	19
I.4.2.1. Análisis simultáneo de múltiples loci	20
I.5. FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL SC.....	20
I.5.1. Importancia del gen <i>PRNP</i>	21
I.5.2. Evolución del SC en España.....	22
I.5.3. Otros genes candidatos	24
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS	29
III.1. ELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS	31
III.2. ANIMALES Y MATERIAL BIOLÓGICO	32
III.2.1. Animales	32
III.2.1.1. Ovinos.....	32

III.2.1.1.1. Búsqueda de polimorfismos.....	32
III.2.1.1.2. Cartografiado genético.....	32
III.2.1.1.3. Estudio de expresión.....	32
III.2.1.1.4. Análisis de asociación	33
III.2.1.2. Ratones	33
III.2.1.3. Conejos	33
III.2.2. Genoteca de Cromosomas artificiales bacterianos (BACs).....	34
III.2.3. Cultivos celulares	34
III.3. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	36
III.3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	36
III.3.1.1. Extracción de ADN genómico	36
III.3.1.2. Extracción de ARN mensajero (ARNm)	36
III.3.1.3. Extracción del ADN de BAC	36
III.3.2. Diseño de cebadores.....	36
III.3.3. Amplificación de ácidos nucleicos	37
III.3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
III.3.3.2. Retrotranscripción y amplificación de ARN (RT-PCR)	37
III.3.4. Visualización de ácidos nucleicos en gel de agarosa	38
III.3.4.1. Visualización de ADN en gel de agarosa	38
III.3.4.2. Visualización de ARN en gel de agarosa	38
III.3.5. Purificación de productos de PCR	38
III.3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos	38
III.3.7. Secuenciación y análisis informático de las secuencias	38
III.3.8. Análisis de polimorfismos	39
III.4. CARTOGRAFIADO DEL GEN	40
III.4.1. Cartografiado Genético: CRIMAP	40
III.4.2. Cartografiado Físico: Hibridación <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH).....	41
III.4.2.1. Cribado de la genoteca por PCR	42
III.4.2.2. Hibridación <i>In Situ</i> Fluorescente	42
III.5. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN	43
III.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN	43
III.6.1. PCR a tiempo real.....	43
III.6.2. Western Blot.....	44
III.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	46
III.7.1. Análisis de expresión por PCR cuantitativa en cerebelo y bazo.....	46

III.7.2. Análisis de asociación de los polimorfismos y la presencia/ausencia de la enfermedad.....	46
IV. RESULTADOS.....	49
IV.1. ANÁLISIS DEL GEN <i>RPSA</i>	51
IV.1.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen <i>RPSA</i> en la especie ovina	51
IV.1.4. Cartografiado del gen	52
IV.1.4.1. Cartografiado genético.....	52
IV.1.4.2. Cartografiado citogenético.....	52
IV.1.4.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen <i>RPSA</i> ovino.....	53
IV.1.4.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC	53
IV.1.5. Caracterización del gen <i>RPSA</i> ovino	55
IV.1.6. Caracterización de la proteína LRP/LR	56
IV.1.7. Análisis de asociación.....	56
IV.1.7.1. Región comprendida entre el exón 4 y intrón 4.....	57
IV.1.7.2. Región comprendida entre el intrón 4 y exón 7.....	58
IV.1.8. Análisis de expresión.....	58
IV.1.8.1. PCR cuantitativa.....	58
IV.1.8.2. Western Blot.....	59
IV.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LRP/LR	60
IV.2.1. Correlación PrP ^c -LRP/LR	60
IV.2.1.1. Modelos celulares que expresan distintas cantidades de PrP ^c	60
IV.2.1.1.1. En células.....	60
IV.2.1.1.2. En el medio de cultivo.....	61
IV.2.1.2. Modelos celulares que expresan PrP ^c de manera condicional	61
IV.2.2. Efecto de la diferenciación sobre LRP/LR.....	62
IV.3. ANÁLISIS DEL GEN <i>HSP90AA1</i>	62
IV.3.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen <i>HSP90AA1</i> en la especie ovina.....	63
IV.3.2. Cartografiado del gen	64
IV.3.2.1. Cartografiado genético.....	64
IV.3.2.2. Cartografiado citogenético.....	64
IV.3.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen <i>HSP90AA1</i> ovino.....	64
IV.3.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC	65
IV.3.2.2.3. Resultados del FISH	65
IV.3.3. Caracterización del gen <i>HSP90AA1</i> ovino	66
IV.3.4. Análisis de asociación.....	66

IV.3.4.1. Región 5' flanqueante.....	67
IV.3.4.2. Región intrón 10-exón11	67
IV.3.5. Análisis de expresión.....	68
IV.4. ANÁLISIS DEL GEN <i>IL1B</i>	69
IV.4.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen <i>IL1B</i> en la especie ovina	69
IV.4.2. Cartografiado del gen	70
IV.4.2.1. Cartografiado genético.....	70
IV.4.2.2. Cartografiado citogenético.....	70
IV.4.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen <i>IL1B</i> ovino	70
IV.4.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC ovino	71
IV.4.2.2.3. Resultados del FISH	71
IV.4.3. Caracterización parcial del gen <i>IL1B</i> ovino	72
IV.4.4. Análisis de Asociación.....	72
IV.4.5. Análisis de expresión.....	74
IV.5. ANÁLISIS DEL GEN <i>IL1RN</i>	74
IV.5.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen <i>IL1RN</i> en la especie ovina....	74
IV.5.2. Cartografiado del gen	75
IV.5.2.1. Cartografiado genético.....	75
IV.5.2.2. Cartografiado citogenético.....	75
IV.5.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen <i>IL1RN</i> ovino	75
IV.5.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC	76
IV.5.2.2.3. Resultados del FISH	76
IV.5.3. Caracterización parcial del gen <i>IL1RN</i> ovino	77
IV.5.4. Análisis de expresión.....	78
V. DISCUSIÓN	79
V.1 DISCUSIÓN SOBRE EL GEN <i>RPSA</i>	81
V.2. DISCUSIÓN SOBRE EL GEN <i>HSP90AA1</i>	85
V.3. DISCUSIÓN SOBRE LOS GENES <i>IL1B</i> E <i>IL1RN</i>	88
VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES/GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	93
VII. BIBLIOGRAFÍA	111
VIII. ANEXOS	127
VIII.1 SECUENCIAS AISLADAS	129
VIII.2. ARTÍCULO <i>IL1B</i> E <i>IL1RN</i>	149
VIII.3. ARTÍCULO <i>HSP90AA1</i>	163
VIII.4. ARTÍCULO <i>RPSA</i>	197

VIII.5. POSTERS	233
IX. GLOSARIO	239

RESUMEN/SUMMARY

El *scrapie* es una encefalopatía espongiforme transmisible que afecta al ganado ovino y caprino. A pesar de que la susceptibilidad a esta enfermedad neurodegenerativa está principalmente controlada por mutaciones puntuales en el locus *PRNP*, se ha demostrado la existencia de otros genes, distintos del *PRNP*, en la modulación de la resistencia/susceptibilidad a *scrapie*. A partir de varios estudios llevados a cabo en Alzheimer y en distintos modelos animales de encefalopatías espongiformes transmisibles, los genes ovinos *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN*, han sido elegidos como posibles genes candidatos posicionales y/o funcionales involucrados en la varianza poligénica anteriormente descrita.

En el presente trabajo se han localizado, aislado y caracterizado total (*HSP90AA1*) o parcialmente (*RPSA*, *IL1B*, *IL1RN*) estos cuatro genes por primera vez en la especie ovina. Los genes *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN* se han cartografiado en regiones que habían sido previamente descritas como responsables de la modulación del periodo de incubación a *scrapie* y otras enfermedades priónicas en experimentos de detección de QTLs en modelos ovinos y murinos. Adicionalmente, con el fin de comprobar su posible contribución a la enfermedad, se llevaron a cabo estudios de expresión y de asociación, mediante un diseño de genotipado selectivo. Se ha demostrado que la expresión de *IL1B* e *IL1RN* (a nivel de ARNm), así como de *RPSA* (a nivel de ARNm y proteína) varían como consecuencia de la infección por *scrapie*. Por otro lado, el estudio de asociación resultó significativo para una serie de SNPs que afectan a posibles regiones reguladoras del gen *HSP90AA1* y a un SNP en la región 5' flanqueante del gen *IL1B* que, puesto que no se ha podido asociar a ningún elemento regulador, pudiera estar en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Asimismo, la presencia de un pseudogen de *RPSA* resultó significativamente sobre-representada en el grupo de animales que permanecieron sanos a pesar de haber pertenecido a rebaños en los que se habían declarado focos de *scrapie*. Por último, se llevó a cabo otro experimento para inferir una posible co-regulación de LRP/LR y PrP^c, pero los resultados no fueron concluyentes.

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy affecting sheep and goats. Although susceptibility to this neurodegenerative disease is mainly controlled by point mutations at the *PRNP* locus, other genes, apart from *PRNP*, have been reported to modulate resistance/susceptibility to scrapie. On the basis of several studies in Alzheimer disease and in different transmissible spongiform encephalopathy models, the ovine *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN*, were chosen as a putative positional and/or functional candidate genes that might be involved in the polygenic variance mentioned above.

Thus, these four genes have been totally (*HSP90AA1*) or partially (*RPSA*, *IL1B*, *IL1RN*) isolated, characterized and mapped in the ovine genome. The localization of *HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN* loci in previously described QTL regions related with scrapie and bovine spongiform encephalopathy incubation period, in both ovine and murine models, was confirmed. Additionally, expression and association analyses were carried out in order to ascertain the possible contribution of these genes to scrapie infection. Thus, it has been demonstrated that the expression of both cytokines (at mRNA level) and of the laminin receptor (at both mRNA and protein level) varies as consequence of scrapie infection. On the other hand, the association analysis revealed several SNPs, affecting putative regulatory elements in *HSP90AA1* gene and a SNP, which could be in linkage disequilibrium with the causal mutation, in *IL1B* gene, which were associated to the different resistance/susceptibility to scrapie infection in the animal sample studied here. Furthermore, the presence of a *RPSA* pseudogene was significantly overrepresented in the group of sheep that, despite being in contact with the scrapie agent, did not develop the disease. An additional experiment was performed in order to infer a possible co-regulation of the *RPSA* and *PRNP* products (LRP/LR and PrP^c, respectively), however the obtained results were not conclusive.

ABREVIATURAS

		A
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico/deoxyribonucleic acid	B
ARN/RNA	Ácido ribonucleico/ribonucleic acid	
		B
BAC	Bacterial artificial chromosome	C
BLR1	Burkit lymphoma receptor 1 gene	
BT	<i>Bos taurus</i>	
BTA	Cromosoma de <i>Bos taurus</i>	
		C
cM	Centimorgan	D
		D
DOX	Doxiciclina	E
		E
EET/TSE	Encefalopatía espongiforme transmisible/transmissible spongiform encephalopathy	F
EGF	Epithelial growth factor	
EEB/BSE	Encefalopatía espongiforme bovina/bovine spongiform encephalopathy	
		F
FGF	Fibroblast growth factor	G
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	
		G
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene	H
GL	Generalized logit	
GPI	Glicofosfatidil-inositol anchor	
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene	
		H
HRP	Horse radish peroxidase	I
HS	<i>Homo sapiens</i>	
HSA	Cromosoma de <i>Homo sapiens</i>	
HSF1	Heat shock factor 1	
HSPA8	Heat shock protein cognate 70 gene	
HSPB2	Crystallin alpha B gene (pertenece a la familia HSP27)	
HSPG	Heparan sulfate proteoglycane	
Hsp90	90kDa heat shock protein	
HSP90AA1	Gen que codifica a Hsp90α	
HSP90AB	Gen que codifica a Hsp90β	
		I
IL-1	Interleukin 1 family	I
IL1A/IL-1α	Interleukin 1 alpha gene/protein	
IL1B/IL-1β	Interleukin 1 beta gene/protein	
IL1RN/IL-1Ra	Interleukin 1 receptor antagonist gene/protein	
IL1R1/IL-1r	Interleukin 1 receptor gene/protein	
IL10RA	Interleukin 1 receptor alpha gene	
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique	
Insdel	Insertion/deletion polymorphism	
		I
		I

		K
KO	Knock out	
K1	Línea de células nerviosas (NF ó NSC) con expresión condicional de PrP ^c regulada por DOX.	
		L
LRP/LR	37kDa laminina receptor precursor/67kDa laminina receptor	
		M
M	Mezcla	
MM	<i>Mus musculus</i>	
MMU	Cromosoma de <i>Mus musculus</i>	
		N
NF	Neuroesfera	
NO	Nitric oxid	
NSC	Neural stem cell (<i>precursor neural</i>)	
		O
OA	<i>Ovis aries</i>	
OAR	Cromosoma de <i>Ovis aries</i>	
		P
PID2	Prion incubation determinant 2 gene	
pb/bp	Pares de bases/base pairs	
PCR	Polymerase chain reaction	
PK	Proteinasa K	
PRDT4	Prion disease incubation time 4	
PRND	Prion protein dublet (or Doppel) gene	
PRNP/PrP	Prion protein gene/ protein	
PRPL3	Prion protein ligand 3	
		Q
QTL	Quantitative Trait Loci	
		R
RE (R)	Retículo endoplásmico (rugoso)	
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	
ROS	Reactive oxygen species	
RPSA	LRP/LR gene	
		S
SADH	Secondary alcohol dehydrogenase gene	
SC	Scrapie	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–poly acrylamide gel electrophoresis	
SLR	Sistema linforreticular	
SM	Supermezcla	
SN	Sistema nervioso	
SNP	Según contexto, single nucleotide polymorphism o SN periférico	
		U
UTR	Untranslated region	

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDADES PRIÓNICAS. GENERALIDADES

I.1.1. Marco histórico

La tembladera o *Scrapie* (SC) es una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al grupo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) que afecta a las especies ovina y caprina (Dickinson 1976) y que también ha sido descrita en otras especies silvestres como el muflón. Se descubre por primera vez la enfermedad en el s.XVIII, y su denominación, scrapie, proviene del vocablo inglés “scrape” (raspar) y en castellano “tembladera”, debido a que los animales infectados mostraban temblores y se rapaban o rascaban la lana constantemente

Sin embargo, el estudio de las EETs no comenzó hasta el s.XX cuando, en 1920, los neurólogos Creutzfeldt y Jacob observaron varios pacientes con lesiones cerebrales tales como espongiosis, astrocitosis y gliosis, y haciendo honor a su nombre, la denominaron enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD). Casi 20 años después, J. Cuillé y P.L. Chelle (1938) demostraron que el SC era una enfermedad transmisible. Pero su hallazgo permaneció largo tiempo en el olvido. Fue el pediatra americano C. Gajdusek (1994) quien recuperó los resultados de estos dos investigadores tras percatarse de las similitudes clínicas y neuropatológicas entre el SC y el kuru, enfermedad endémica humana que en esa época se estudiaba en Nueva Guinea. El equipo de Gajdusek comenzó a inocular tejido cerebral de pacientes muertos de kuru, por vía intracerebral, a chimpancés. Así, lograron comprobar que efectivamente, tal como sospechaban, el kuru era transmisible. En 1968 se demostró la transmisibilidad de la CJD, que en un principio se había clasificado como una enfermedad degenerativa del sistema nervioso.

Actualmente, las EETs engloban un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan a diferentes especies animales incluida la humana. Estas enfermedades se caracterizan por presentar alteraciones neurológicas y afectar a distintas zonas del sistema nervioso central produciendo vacuolización neuronal y gliosis, lo que confiere al tejido neuronal un aspecto espongiforme (Kordek 2000). Todas ellas son de desarrollo lento y desenlace fatal. Las EETs presentan la particularidad de ser infecciosas (transmisibles) y a su vez estar asociadas también a factores genéticos (formas familiares - hereditarias) y aleatorios (formas esporádicas). Tras tiempos de incubación prolongados, las EETs producen trastornos neurológicos que pueden incluir alteraciones cerebelosas (ataxia, temblores, pérdida del equilibrio, discapacidad motora, etc), demencia, trastornos psiquiátricos, cambios comportamentales, insomnio, pérdida de la capacidad autonómica, etc.

I.1.2. Naturaleza del agente causal de las EETs

Durante muchos años, los científicos se refirieron al agente infeccioso que causaba las EETs como un virus lento (Lasmezas 2003). Por su parte, Dickinson y Outram (Dickinson and Outram 1988) desarrollaron la teoría del virino. Este patógeno estaría formado por una molécula no identificada que codificaría la información específica para cada cepa y que estaría unida y protegida por una proteína del hospedador. Sin embargo, la extrema resistencia del agente causal de las EETs a la acción de la radiación ultravioleta e ionizante, así como a la esterilización por calor y otros compuestos químicos, planteó nuevas dudas en el mundo científico respecto a la naturaleza de éste (DeArmond y Prusiner 1995).

Griffith y Latarget fueron los primeros investigadores que, de forma independiente, propusieron que el polémico agente infeccioso podría ser de naturaleza puramente proteica. Esta hipótesis fue reformulada en la hipótesis del Prión de Prusiner (Prusiner 1982). Así, el término prión (término derivado de *proteinaceous infectious particles*) distinguía el patógeno causante del SC de los virus y viroides, al descubrir que su infectividad no era atenuada por procedimientos que modifican ácidos nucleicos e inactivan a los virus, pero sí por tratamientos que alteran proteínas (DeArmond y Prusiner 1995).

Sin embargo, la cuestión de si el prión, tal y como lo define Prusiner, es el único componente infeccioso aún no está del todo resuelta. Varios estudios demuestran que otros elementos, además de una única proteína (PrP, del inglés *prion protein*), podrían estar involucrados en el desarrollo de las EETs. Este cofactor, si existiera, podría ser una proteína o cualquier otro componente celular, incluyendo un ácido nucleico (Deleault *et al.* 2003; Weissmann 1991; Zeiler *et al.* 2003).

I.1.3. Importancia de las EETs para el hombre

Tras la detección de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en Reino Unido, la enfermedad se diseminó de forma generalizada en la población bovina de este país, alcanzando la epidemia su punto álgido a finales de año 1992. En 1996, se identificó una nueva enfermedad en el hombre, denominada nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, cuyas características hicieron sospechar que era consecuencia de la transmisión del agente causal de la EEB al hombre, demostrándose así la transmisibilidad de los priones desde la especie bovina a la humana. Por el contrario, hasta la fecha no se ha podido demostrar este hecho con el SC. Sin

embargo, si ha sido descrita la infección del ganado ovino (y recientemente también caprino) con EEB, lo que da lugar a una encefalopatía ovina con una sintomatología similar a la del SC. Por lo tanto, la alarma surge de la posibilidad de transmisión al hombre de esta nueva encefalopatía por consumo de ovinos infectados con EEB.

La magnitud de la epidemia de la EEB en Reino Unido, la asociación existente entre esta enfermedad y la nueva variante de Creutzfeldt y la detección de nuevos casos de EEB en diversos países europeos, dio lugar a la implantación e intensificación de diversas medidas cuyo objetivo principal era evitar la diseminación generalizada de la enfermedad en la cabaña bovina europea y su transmisión a otras especies animales y al hombre. Las principales medidas establecidas han sido: prohibición del uso de las harinas de carne y hueso en la alimentación de los animales de producción ganadera; exclusión de la cadena alimentaria humana de los materiales específicos de riesgo (MER); implantación de un programa de vigilancia y control de las EETs, así como la selección genética de animales portadores de alelos de resistencia (véase apartado I.5.).

I.1.4. La PrP^c en la célula

Los priones son isoformas anormales de una glicoproteína, la PrP, codificada por el organismo hospedador. Las secuencias de aminoácidos de PrPs obtenidas de cerebros de animales sanos y enfermos son idénticas, y ambas proteínas difieren exclusivamente en sus características bioquímicas y biofísicas. La isoforma relacionada con la enfermedad, denominada isoforma SC (PrP^{sc}), es derivada de su precursor celular, PrP^c, por un proceso post-traducciona

I.1.4.1. Síntesis y localización de la PrP^c

La expresión del gen que codifica la PrP (*PRNP*) ocurre constitutivamente en tejidos neuronales y no neuronales de animales adultos, detectándose los niveles más altos en las neuronas (Lasmezas 2003).

La PrP^c es una proteína de membrana que es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y viaja a través del aparato de Golgi hasta llegar a la membrana. Durante el proceso de biosíntesis, la PrP^c sufre varias modificaciones postraduccionales, incluyendo el corte del péptido señal, la adición de cadenas de oligosacáridos a dos moléculas de Asp localizadas en las posiciones 181 y 197 de la proteína, la formación de un puente disulfuro y la adición de una

molécula de glicofosfatidilinositol (GPI), a través de la que se mantendrá anclada a la cara extracelular de la membrana en dominios lipídicos, ricos en colesterol y esfingolípidos, llamados *rafts* (Borchelt *et al.* 1992). En la Fig.1 muestra la organización de esta proteína.

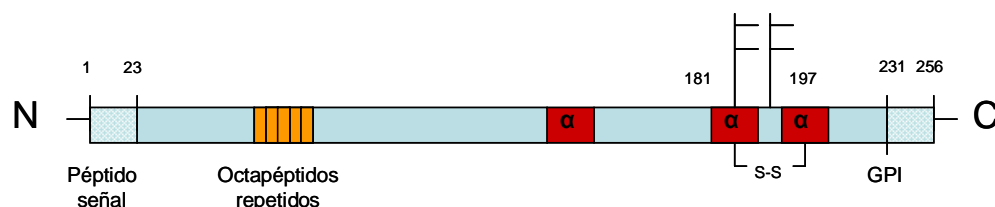


Fig. 1 Organización de la PrP^c.

En cultivos celulares se ha observado que la PrP^c es constantemente internalizada para volver de nuevo a la membrana (Harris 2003; Prado *et al.* 2004). Durante este proceso, un pequeño porcentaje de las moléculas endocitadas sufren una rotura proteolítica tras la cual fragmentos de PrP son entonces expulsados (Shyng *et al.* 1993). El mecanismo de internalización está actualmente en debate: parece que las caveolas, los *rafts* y las vesículas recubiertas de clatrina están involucrados en el proceso. Se ha demostrado que la región N-terminal de la PrP^c es esencial para la localización e internalización por medio de la última de estas vías. Según esta hipótesis, la PrP^c se uniría, por su extremo N-terminal, a alguna proteína transmembrana mediando así su entrada en la célula (Sunyach *et al.* 2003). El receptor de laminina (LRP/LR), como se verá más adelante, es un candidato potencial implicado en este proceso, sin embargo, este receptor sería sólo responsable de un 25-50% de la entrada total de PrP^c en la célula (Gauczynski *et al.* 2001a). Así pues, la internalización de PrP^c ha de implicar factores adicionales, o bien ocurrir por rutas alternativas a las vesículas de clatrina. (Lee *et al.* 2003; Peters *et al.* 2003). Los diferentes mecanismos de entrada podrían dar lugar a un amplio abanico de posibilidades para la conversión proteica y la expansión de los priones.

1.1.4.2. Funciones celulares de la PrP^c

La función de la PrP^c ha sido ampliamente estudiada en modelos celulares y ratones knock-out dando lugar a resultados controvertidos. Sin embargo, el grado de conservación de esta proteína en varias especies sugiere que debe tener relevancia en procesos fisiológicos importantes (Campana *et al.* 2005). Entre las posibles funciones que la PrP^c podría desempeñar, bien sola o interactuando con otros ligandos o efectores, destacan: transporte o metabolismo del cobre y/o zinc (Brown 2001; Pauly y Harris 1998; Watt y Hooper 2003); protección frente a estrés oxidativo (Brown *et al.* 2001); señalización celular (Chiarini *et al.* 2002; Mouillet-Richard *et al.*

2000); excitación de membrana y transmisión sináptica (Mallucci *et al.* 2002); neuritogénesis (Graner *et al.* 2000); apoptosis (Chiarini *et al.* 2002; Solforosi *et al.* 2004) y funciones relacionadas con la memoria (Papassotiropoulos *et al.* 2005).

Puesto que ratones a los que se les ha eliminado el gen *PRNP* son resistentes a la infección por priones (Bueler *et al.* 1993), la única certeza que se tiene hasta el momento es su imprescindibilidad para propagar la infección.

1.1.4.3. PrP^c vs PrP^{sc}

La PrP^c es una proteína proteasa-sensible constituida por una sola cadena peptídica que posee una estructura rica en hélices alfa (42% hélices alfa, 3% láminas beta). En su forma normal, no infecciosa, es una glicoproteína hidrófoba soluble en presencia de cantidades significativas de solutos solubles no polares.

Por el contrario, la PrP^{sc} presenta gran proporción de láminas beta (43% láminas beta, 30% hélices alfa), es parcialmente resistente a proteasas, tiene capacidad de agregarse formando placas amiloides extracelulares, y, purificada por centrifugación, al microscopio electrónico, presenta aspecto de fibrillas o bastoncillos que corresponden a polímeros de PrP^{sc} .

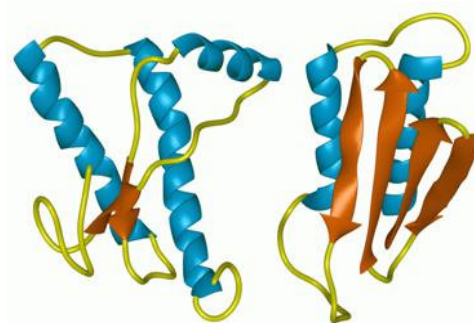


Fig. 2 Estructura espectral derivada de la predicción por resonancia magnética nuclear de la PrP^c (izq.) y PrP^{sc} (deh.).

Una característica destacable de las EETs es la existencia de distintas cepas o strains de priones que se caracterizan por producir un fenotipo específico de la enfermedad cuando se inoculan en líneas concretas de ratones; dicho fenotipo se manifiesta principalmente en la duración del periodo de incubación y en la distribución de las lesiones (perfil lesional) y de los depósitos de PrP^{sc} en el SNC (DeArmond *et al.* 1993; Fraser y Dickinson 1968). Por otro lado, algunas cepas se pueden diferenciar bioquímicamente por diversas características como la cantidad relativa de

las formas glicosiladas de la proteína, la distinta susceptibilidad a la digestión por proteinasa K (PK), la movilidad electroforética tras el tratamiento con PK (Bessen y Marsh 1994), o la susceptibilidad a la desnaturalización por el cloruro de guanidina (Collinge *et al.* 1996; Monari *et al.* 1994; Safar *et al.* 1998).

De acuerdo con la hipótesis de “solo proteína”, se asume que cada cepa está asociada con una conformación patológica diferente de PrP, lo que implica que la misma proteína puede presentar diferentes conformaciones y transmitir diversos fenotipos de la enfermedad (Prusiner 1991; Safar *et al.* 1998; Telling *et al.* 1996).

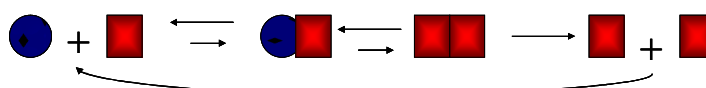
I.1.5. Mecanismo de conversión

Como se ha descrito anteriormente, ambas formas, PrP^c y PrP^{sc}, son codificadas por el gen *PRNP*. Diversos estudios han puesto de manifiesto que PrP^{sc} es un derivado post-traducciona de PrP^c. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que PrP^{sc} se acumula lentamente en los cerebros de los animales infectados, mientras que los niveles de ARNm permanecen invariables durante la evolución de la enfermedad (Basler *et al.* 1986; Oesch *et al.* 1985). La propia PrP^{sc} actúa hipotéticamente como promotora de la conversión de PrP^c a nueva PrP^{sc} y los organismos infectados acumulan su propia PrP^{sc} y no la PrP^{sc} originaria de la infección (Hill *et al.* 2000). Sin embargo, el mecanismo de síntesis de PrP^{sc} es todavía desconocido.

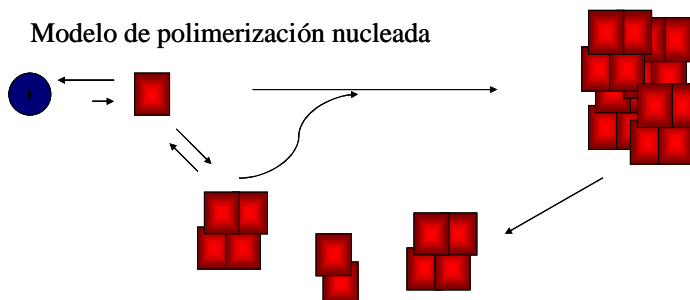
Por otra parte, Caughey y Raymond (1991) demostraron que el precursor de PrP^{sc} se localiza en la superficie celular. De manera que, el paso de PrP^c a PrP^{sc} podría tener lugar en el primer sitio de interacción entre las dos isoformas proteicas, la membrana celular; o inmediatamente después de su internalización, en el compartimento endolisosómico (Prado *et al.* 2004). Otra posibilidad es que tras su internalización, la PrP^{sc} sea, de algún modo, transportada al aparato de Golgi y/o al retículo endoplásmico (RE), perturbando la síntesis de nueva PrP^c y dando lugar a la formación de PrP^{sc}. En las enfermedades de tipo genético, el RE podría suponer el lugar en el que las moléculas mutantes de PrP son espontáneamente convertidas a PrP^{sc} (Harris 2003). Los datos de los que se dispone por el momento, sugieren que tanto la membrana celular como el RE son importantes y que podrían estar involucrados de manera distinta en el proceso de transformación.

Sea cual fuere el compartimento celular, la conversión de PrP^c a PrP^{sc} ha sido explicada según dos modelos: Modelo del heterodímero y modelo de polimerización nucleada (Fig. 3).

Modelo del heterodímero



Modelo de polimerización nucleada

Fig. 3 Modelos para explicar la conversión de PrP^C (círculo azul) a PrP^{Sc} (cuadrado rojo).

1.1.5.1. Modelo del heterodímero

Este modelo postula que la PrP^{Sc} actuaría como molde asociándose a una molécula de PrP^C, hecho que imprime a ésta la conformación anormal de su homólogo aberrante, formándose un heterodímero que finalmente rinde dos moléculas de PrP^{Sc} capaces de generar nuevas conversiones (Prusiner 1991).

1.1.5.2. Modelo de polimerización nucleada

Este otro modelo propone que las moléculas de PrP^{Sc} se agregan formando un núcleo compuesto de oligómeros de PrP^{Sc}, al que posteriormente se añaden más moléculas hasta alcanzar un tamaño crítico, momento en el que se fragmenta, aumentando así la superficie de agregación y extendiendo la enfermedad por el SNC. En este modelo, la PrP^C y PrP^{Sc} están en un equilibrio que favorece la conformación de PrP^C. La PrP^{Sc} sólo se estabiliza cuando es integrada en agregados. A pesar de que la formación de estos agregados es difícil, una vez formados, la incorporación de más monómeros es rápida. Actualmente este es el modelo más aceptado (Caughey 2001; Silveira *et al.* 2005).

Sea cual fuere el mecanismo de replicación de la PrP^{Sc}, finalmente la acumulación de agregados de PrP^{Sc} en diversas partes del cerebro resulta extremadamente tóxica para las células. En

consecuencia, se acaba produciendo la espongiosis, gliosis y muerte neuronal, pruebas histológicas definitivas a la hora de diagnosticar la enfermedad.

I.1.6. Barrera de especie

La transmisión de priones dentro de una misma especie es un proceso que ocurre eficientemente. Sin embargo, existe una fuerte barrera de transmisión entre determinadas especies (Kocisko *et al.* 1995; Pattison y Jones 1968; Prusiner *et al.* 1990), incluso algunas, como la porcina, la canina y la cunícula, parecen ser muy resistentes a la infección (Castilla *et al.* 2004; Knorr *et al.* 2007; Lysek *et al.* 2005). El efecto biológico de la "barrera de especie" consiste en el incremento del periodo de incubación de la enfermedad y la disminución de número de animales afectados por la misma, en relación a los mismos parámetros cuando el agente infeccioso se transmite intraespecíficamente (Hill *et al.* 2000).

La barrera de especie ha sido definida atendiendo a la homología entre la PrP^{sc} entrante y la PrP^c del huésped. Una identidad del 100% entre ambas isoformas supone ausencia de barrera de especie (Prusiner *et al.* 1990). Estudios recientes comienzan a considerar la posibilidad de que ciertas partes de la molécula de PrP, como la región central de la misma, sean particularmente importantes en el proceso de transmisión (Bueler *et al.* 1993). No obstante, cada vez parece más claro que también las diferencias conformacionales, independientemente de la secuencia de aminoácidos, podrían ser un factor determinante (Peretz *et al.* 2001). Adicionalmente, otro factor que parece contribuir a la "barrera de especie" es la posible existencia del denominado factor X. Este sería un factor, específico del huésped, que se uniría a la PrP^c facilitando la entrada y/o formación de PrP^{sc} (Hill *et al.* 2000; Prusiner 1998). Así, variaciones puntuales en la secuencia de la PrP o del factor X podrían afectar a la conformación local o a la carga de estas proteínas. Estas sutiles diferencias podrían ser suficientes para modificar la barrera entre dos especies.

Por otra parte, es de destacar que, tras la transmisión interespecífica, la PrP^{sc} sintetizada de novo refleja la secuencia del gen *PRNP* del hospedador y no la secuencia de la PrP^{sc} del inóculo, aunque mantiene las propiedades de este último (Prusiner 1991).

I.1.7. Mecanismo de propagación

La principal vía de transmisión de los priones es la vía oral, asociada a la ingestión de material contaminado con dicho agente que alcanza el sistema nervioso central mediante un proceso denominado neuroinvasión. En modelos experimentales se ha observado que existen dos rutas principales de neuronvasión (Fig. 4), que dependen de diversas variables tales como la dosis del agente infeccioso, el lugar de inoculación, la cepa del prion y el genotipo del hospedador. Una vía es la directa a través del sistema nervioso periférico (SNP) y otra, la que implicaría la participación del sistema linforreticular (SLR) y el bazo en la amplificación del agente infeccioso, previamente a la invasión del sistema nervioso periférico, especialmente cuando la dosis del agente es baja (Beekes y McBride 2000; Glatzel y Aguzzi 2001; Mabbott y Bruce 2001; Race *et al.* 2000). El sistema nervioso entérico parece ser el punto de entrada de los priones en el sistema nervioso (van Keulen *et al.* 1999).

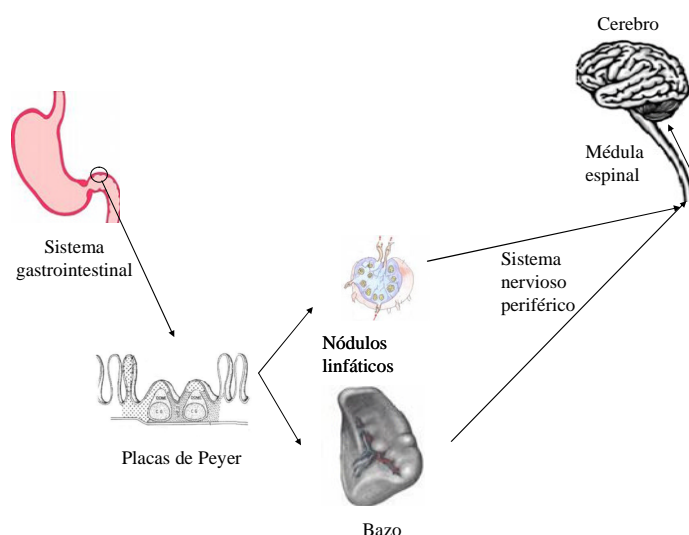


Fig. 4 Modelo de propagación de priones tras la infección por vía oral.

En los casos naturales de SC, la PrP^{Sc} se acumula inicialmente en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (placas de Peyer, folículos linfoides de la mucosa y ganglios linfáticos mesentéricos), propagándose posteriormente al resto del sistema linfático (Andreoletti *et al.* 2000; van Keulen *et al.* 2002).

Una vez alcanzado el sistema nervioso central, la PrP^{Sc} se disemina de forma ascendente y descendente por el mismo, desencadenando la neurodegeneración (Kimberlin y Walker 1980). El patrón neurodegenerativo es variable. Está relacionado con el patrón de acumulación de PrP^{Sc} y

con la susceptibilidad de los distintos tipos celulares a la acumulación de priones. También, depende de la especie y del fondo genético del hospedador, así como de la cepa de prión (Giese y Kretzschmar 2001).

Los mecanismos patogénicos que dan lugar a la neurodegeneración no se conocen con exactitud (Aguzzi y Polymenidou 2004). Las líneas de investigación desarrolladas en este aspecto apuntan hacia las vías que se indican a continuación: presencia de la PrP^{sc} en la célula (Bouzamondo *et al.* 2000; DeArmond *et al.* 1993; Giese *et al.* 1998; Ye *et al.* 1998); fallos o sobrecarga en los mecanismos celulares de degradación de proteínas (Dimcheff *et al.* 2003; Ma *et al.* 2002); o la producción de citoquinas por parte de las células de la glía activadas (Williams *et al.* 1997). También hay que considerar que el mal funcionamiento del mecanismo de endocitosis podría estar involucrado en la patogénesis de las enfermedades priónicas al fallar las rutas de señalización en las que la PrP^c participa (Chiarini *et al.* 2002; Mouillet-Richard *et al.* 2000).

1.2. DAÑO CELULAR Y NEURODEGENERACIÓN

La apoptosis neuronal es la característica principal de las enfermedades priónicas. Sin embargo, no se sabe con exactitud cual o cuales son los mecanismos que desencadenan este tipo de muerte celular. A este respecto existen dos hipótesis que no son mutuamente excluyentes: hipótesis de ganancia de función e hipótesis de pérdida de función. La primera de ellas, se basa en que la acumulación de PrP^{sc} en el transcurso de la enfermedad podría ser, directa o indirectamente, neurotóxica. La segunda, en que la conversión de PrP^c a PrP^{sc} podría reducir la cantidad de PrP^c funcional disponible, afectando negativamente a la supervivencia celular. En este sentido, se ha demostrado que PrP^c desempeña una función tipo superoxidodismutasa, ayudando en la eliminación de radicales libres. De manera que, cuando la actividad de PrP^c se ve comprometida, ésta no puede ejercer su papel antioxidante y las especies de ROS se acumulan (Brown 2005). Además, se ha propuesto que LRP/LR y PrP^c interaccionan con distintas moléculas de laminina de la matriz extracelular, en el cerebro. Cuando las interacciones entre estas proteínas no son las correctas, se favorece la apoptosis. De modo que si las moléculas de PrP^{sc} secuestran a LRP/LR y PrP^c, y éstas no pueden interaccionar con sus respectivas lamininas, el daño neuronal puede verse incrementado (Baloui *et al.* 2004).

Existen fuerte evidencias que apoyan la idea de que la acumulación de agregados proteicos en el cerebro juega un papel fundamental en la neurodegeneración (Walsh y Selkoe 2004). Por otra

parte, la toxicidad de la PrP^{sc} parece depender de la expresión de PrP^c y de la activación de la microglía. A continuación se presentan alguno de los aspectos fundamentales que parecen estar involucrados en la muerte neuronal característica de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo las EETs.

I.2.1. Agregación de proteínas y citotoxicidad

Al igual que ocurre en otras neuropatías, el factor clave de las EETs es la acumulación de agregados de proteínas mal conformadas. El sistema de control de calidad de proteínas, entre los que se encuentran las chaperonas y el sistema de degradación de proteínas ubiquitina-proteosoma podrían estar involucrados en el desarrollo de las enfermedades priónicas (Berke y Paulson 2003).

Las chaperonas, también conocidas como proteínas de choque térmico (Hsps, del inglés heat-shock-protein), son proteínas esenciales que participan en el mantenimiento de la correcta conformación de las proteínas, evitan la agregación de éstas y promueven la supervivencia celular en condiciones de estrés (Soti *et al.* 2005). El sistema ubiquitina-proteosoma es la principal ruta, no lisosomal, de degradación de proteínas de vida corta, mal conformadas y/o dañadas (Glickman y Ciechanover 2002).

En condiciones normales, las proteínas se encuentran en equilibrios dinámicos con varias conformaciones proteicas, incluyendo formas parcialmente ensambladas, agregadas y precursoras de éstas. Estos equilibrios se encuentran desplazados a favor de las formas nativas, pero pueden revertirse hacia las formas no nativas como consecuencia de mutaciones, modificaciones químicas o condiciones desestabilizantes del medio, como la aparición de PrP^{sc} (Fig.5). Las proteínas mal conformadas quedan desprovistas de su función biológica y suelen tener tendencia a agregarse o a interaccionar inapropiadamente con otros componentes celulares comprometiendo la viabilidad de las células.

En algunos desordenes neurodegenerativos, el funcionamiento de las chaperonas y del proteosoma pueden verse perturbados al ser secuestrados en agregados proteicos como consecuencia de la sobrecarga de su capacidad por las proteínas en estados conformacionales aberrantes. Una de las consecuencias del mal funcionamiento de estos sistemas es la inducción de apoptosis y el aumento de la vulnerabilidad neuronal a daños posteriores (Kang *et al.* 2004).

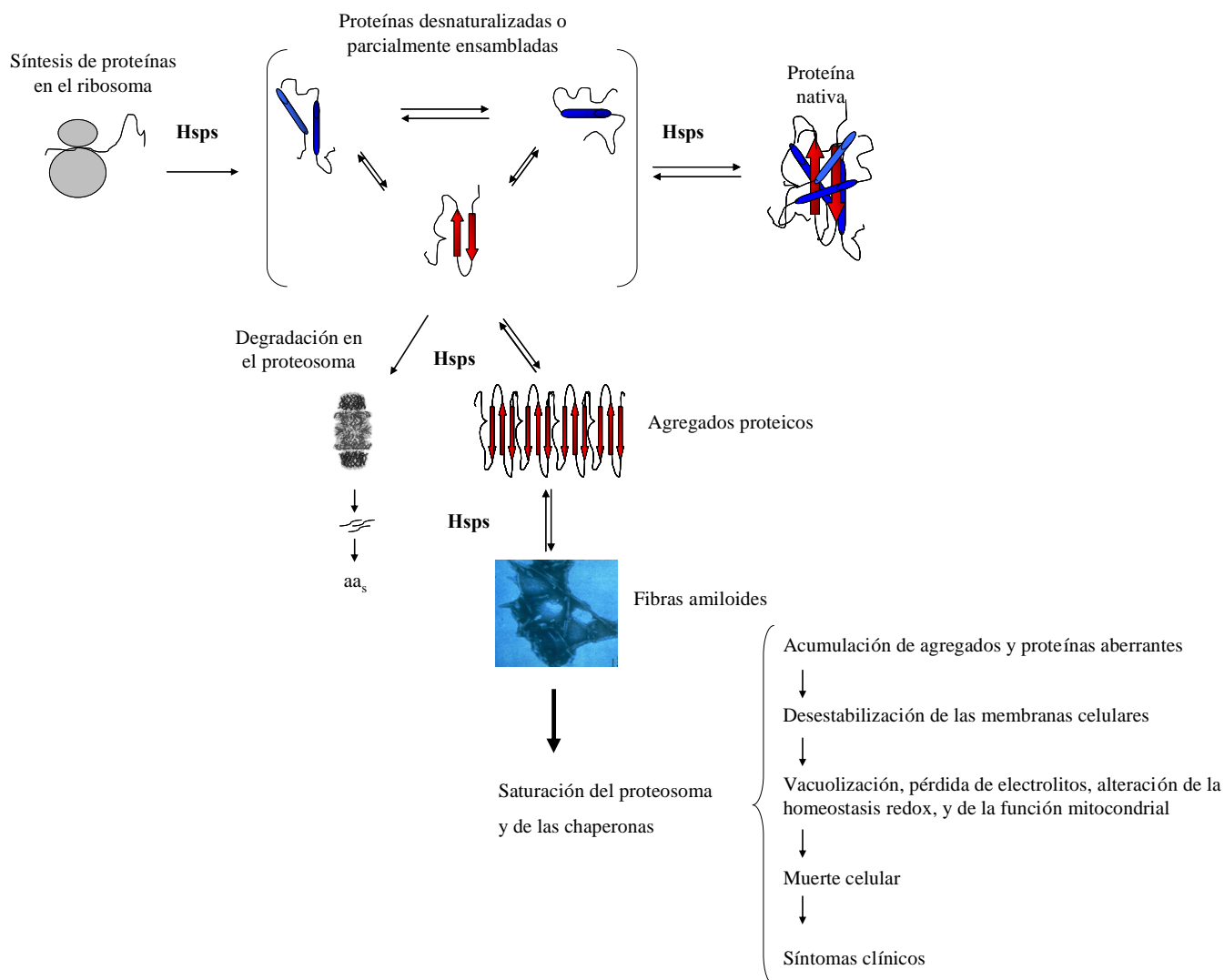


Fig. 5 Posibles estados de las proteínas en la célula y consecuencia del desplazamiento del equilibrio hacia formas proteicas aberrantes con tendencia a agregarse.

Se ha propuesto que la acumulación de agregados amiloides, provoca alteraciones a nivel de membrana que podrían ser consecuencia de procesos como la formación de poros amiloides inespecíficos, la peroxidación de lípidos o la modificación química de proteínas de membrana. Como resultado se produce la entrada de Ca^{2+} en la célula, aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se modifica el estado redox en la célula. También se han observado cambios en las especies reactivas de nitrógeno, peroxidación de lípidos, desregulación del metabolismo del NO, nitrosilación de proteínas y sobreexpresión de marcadores de estrés oxidativo. Además, el daño por este tipo de estrés influye en la actividad y en los niveles de expresión del proteosoma y por tanto, en la viabilidad celular. Como consecuencia de la inhibición del proteosoma se acumulan proteínas oxidadas y dañadas aumentando los efectos perjudiciales del daño por ROS (Stefani y Dobson 2003).

I.2.2. Microglía y muerte neuronal

Hasta hace poco, se consideraba que el SNC permanecía ajeno a los procesos inflamatorios (Lucas *et al.* 2006). Sin embargo, son muchos los trabajos que demuestran que en condiciones patofisiológicas del SNC, la microglía y los macrófagos derivados de la sangre son activados y rápidamente reclutados allí donde se detecta el daño. La presencia de células dañadas y de restos celulares hace que la microglía, que en condiciones normales se encuentra inactiva, pase a estado activado, produciendo citoquinas y factores tróficos que producen diversos efectos en las células vecinas (Fig.6).

No está claro si la microglía actúa como las primeras células citotóxicas o como una respuesta secundaria a la neurodegeneración progresiva. Es posible que, inicialmente, la microglía ejerza un papel protector en la supervivencia neuronal, mientras que, a medida que avanza la enfermedad y la activación de ésta se prolonga, la microglía activada contribuya en la exacerbación de la patología.

En este contexto, parece que la neurodegeneración característica de las EETs es consecuencia de una “respuesta inflamatoria localizada”, mediada por la microglía. La activación de las células microgliales se corresponde con el patrón de acumulación de PrP^{sc}, precede a la muerte neuronal y posee un patrón específico según el modelo de EETs (Rezaie y Lantos 2001). Así, la acumulación de PrP^{sc} tiene lugar en los primeros estadios de las EETs. Como consecuencia de la presencia de grandes cantidades de PrP^{sc}, las neuronas afectadas mueren y parece que son eliminadas por las células microgliales activadas. A pesar de que se desconoce con exactitud el mecanismo responsable de la apoptosis neuronal, la acumulación de PrP^{sc} en compartimentos lisosomales de las neuronas, los cambios en la integridad de la matriz extracelular y/o la liberación de compuestos citotóxicos por parte de la microglía activada podrían estar involucrados. Adicionalmente, la degeneración neuronal generalizada induce de manera continuada la activación de la microglía contribuyendo a potenciar el daño (Lucas *et al.* 2006).

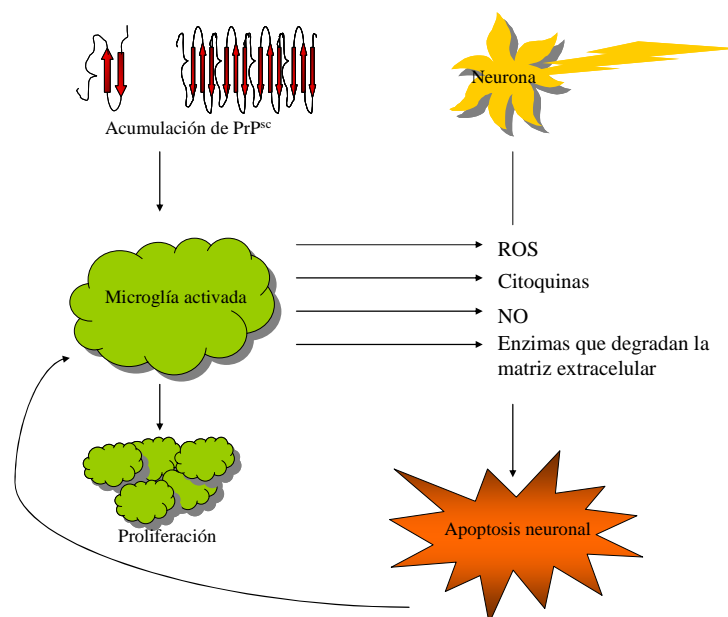


Fig. 6 Contribución de la microglía a la muerte neuronal como consecuencia de la presencia de PrP^{sc}

I.3. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA Y DETECCIÓN DE GENES CON EFECTO SOBRE CARACTERES CUANTITATIVOS

La selección tradicional ha producido enormes avances en la producción animal en la última parte del siglo XX. El progreso genético para caracteres productivos de interés en ganadería se ha conseguido a través de la selección de los animales por su mérito o valor genético. En la mejora genética animal clásica, el valor genético de los animales para una o varias características, se estima a través del conocimiento de los registros productivos de éstos (fenotipo), las circunstancias ambientales en que se producen (factores ambientales) y sus relaciones de parentesco (registros genealógicos). Sin embargo, el impresionante desarrollo del conocimiento del genoma y el desarrollo de potentes innovaciones tecnológicas han abierto nuevas posibilidades que permiten la identificación directa de genes, o de regiones genómicas, responsables de la expresión de los caracteres de interés, así como la selección directa de los animales que porten los alelos favorables en dichos genes.

La mayoría de los caracteres de importancia en producción animal están controlados por la acción de muchos genes. El efecto conjunto de estos genes produce una variación continua (o cuantitativa) entre animales en caracteres tales como la tasa de crecimiento, producción de leche, resistencia a enfermedades, etc. Actualmente existen dos estrategias para localizar los genes que controlan este tipo de caracteres. La primera, emplea diseños familiares para hacer un “barrido” del genoma mediante marcadores genéticos tales como secuencias microsatélite, ampliamente

representadas en el genoma y muy polimórficas, con el fin de localizar regiones cromosómicas que estén asociadas con la variación del carácter de interés en una determinada especie. Las regiones en las que se observa una influencia sobre algún rasgo cuantitativo se denominan QTLs (del inglés *Quantitative Trait Loci*). En estas regiones, se buscan genes que por su función pudieran ser los responsables de las variaciones observadas en el carácter estudiado. Si no se dispone de mapas genéticos de la especie analizada, se buscan genes por mapeo comparativo y homología con otras especies. Otra aproximación es la denominada como gen candidato, que se basa en el estudio de genes de los que se conoce su función fisiológica (candidatos funcionales) y/o su localización genética (candidatos posicionales), y que su función y/o posición sugieren su posible asociación con la variación fenotípica observada para el rasgo de interés. Cuando se analiza un gen candidato, el procedimiento habitual consiste en buscar, mediante la secuenciación de ADN (genómico o ADNc), nuevas mutaciones que puedan estar asociadas al fenotipo que presente variación en las muestras disponibles (resistencia/susceptibilidad a SC), o bien analizar las posibles mutaciones ya descritas en la especie que se está estudiando y determinar la asociación, si es que existe, con el carácter de estudio.

I.4. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son biomoléculas de tipo proteína (antígenos e isoenzimas) y ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) que se pueden relacionar con un rasgo genético. Éstos han servido como base para la identificación de especies, de cepas, de híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, biología evolutiva, ecología molecular, etc.

A lo largo de las últimas décadas, los avances revolucionarios en la genética molecular han permitido el desarrollo de varios tipos de marcadores moleculares basados en los polimorfismos de la secuencia del ADN.

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades. Así, el cambio de un único nucleótido, si ocurre en una zona codificante, puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, y ello puede resultar en una

modificación de su actividad o función. Los cambios también pueden ocurrir en zonas reguladoras o en el promotor de un gen y modificar su expresión. Otras veces, probablemente la mayoría, los cambios no tienen repercusiones funcionales. Mientras que sólo estudios moleculares específicos pueden poner de manifiesto si los polimorfismos son silentes o no, los estudios epidemiológicos son fundamentales para valorar si hay efectos en la salud de la población objeto de estudio.

I.4.1. Análisis descriptivo de un polimorfismo

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base. A éstos se les llama polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Otros polimorfismos son repeticiones en tandem de una secuencia corta que se repite un número variable de veces (*variable number tandem repeat*, VNTR). En otras ocasiones, los polimorfismos se deben a inserciones o eliminaciones de secuencias cortas de nucleótidos (Indels).

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variante se le denomina alelo. En el caso de existencia de variación, un locus puede tener 2 (locus bialélico) ó más (locus multialélico) alelos. Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico, cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo.

La descripción estadística de los polimorfismos consiste, en primer lugar, en estimar la proporción de sus alelos en la población y de los genotipos posibles, lo que en nomenclatura genética se denomina estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente.

Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores (Tabla 1), los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante.

I.4.1.1. Generación de los Marcadores Moleculares

Actualmente existen diversas técnicas para detectar polimorfismos y cada una de ellas presenta ventajas y desventajas ya que generan diferente cantidad y calidad de información. Por ello, es conveniente adaptar la técnica según se enfoque al estudio particular de una especie, población o estirpe. En la Tabla 1 se resumen las principales técnicas de detección de polimorfismos. Todas estas metodologías incluyen la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la cual permite hacer múltiples copias de fragmentos de ADN, utilizando pequeñas secuencias oligonucleotídicas, llamadas cebadores, que reconocen una secuencia específica en el ADN a analizar.

Tabla 1. Tipos de Marcadores Moleculares de ADN nuclear, sus características y aplicaciones potenciales

Marcador	Siglas	Información Previa ²	Herencia Mendeliana	Locus investigado	Número de alelos ²
Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción	RFLP	Si	Codominante	Únicos	2
Amplificación aleatoria de DNA polimórfico	RAPD AP-PCR	No	Dominante	Múltiple	2
Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados	AFLP	No	Dominante	Múltiple	2
Microsatélites	SSR	Si	Codominante	Único	Múltiple
Etiquetas de secuencias expresadas	EST	Si	Codominante	Único	2
Polimorfismo de un solo Nucleótido	SNP	Si	Codominante	Único	2-4
Inserciones/eliminaciones	Indels	Si	Codominante	Único	2

¹ Requiere tener información previa sobre el gen, o locus a estudiar.

² Número probable de alelos que pueden ser investigados a la vez.

I.4.2. Análisis de asociación de polimorfismos con caracteres de interés

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles. El grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente suele considerarse como la categoría referencia.

Para evaluar la asociación de un polimorfismo con variables categóricas como la presencia/ausencia de la enfermedad, se construye la tabla de contingencia correspondiente y se

puede contrastar la hipótesis de asociación genotipos-variable mediante un test chi-cuadrado (χ^2). Si es necesario ajustar los análisis por posibles factores de ruido, entonces es preferible emplear modelos de regresión logística por su versatilidad. Además, estos modelos permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores.

En el caso de estar analizando variables continuas, como el peso o la cantidad de leche, se recurre a otro tipo de metodología como los modelos mixtos o la anova.

I.4.2.1. Análisis simultáneo de múltiples loci

Con frecuencia son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en un gen o región candidata del genoma. El motivo es que el polimorfismo realmente responsable de influir o modificar el riesgo de la enfermedad es desconocido. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí, debido a la baja probabilidad de que se produzca recombinación cromosómica durante la meiosis, suele observarse cierto grado de asociación física que en estadística se denomina desequilibrio de ligamiento y cuya magnitud es estimada en función de la tasa de recombinación.

Si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella no de manera casual, si no por su desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo responsable. De hecho, como lo que se transmite de padres y madres a sus hijos son cromosomas, suele ser interesante identificar el conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente en cada cromosoma, de manera que sea más fácil así identificar el polimorfismo causal. A este conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se le denomina haplotipo. Un individuo, para un conjunto de loci cercanos, posee 2 haplotipos, cada uno en un cromosoma.

I.5. FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL SC

La neurodegeneración es la consecuencia final de un proceso complejo constituido por múltiples etapas. Puede originarse por diversos mecanismos patogénicos en los que un evento inicial, como la herencia de un gen en particular, interacciones gen-gen, factores ambientales o la contribución de interacciones gen-ambiente, puede dar lugar a la formación de un daño concreto (Migliore y Coppede 2002). Por otra parte, el papel de los polimorfismos genéticos en la neurodegeneración ha sido investigado recientemente, haciendo patente que polimorfismos en el

DNA son responsables no sólo de modular el riesgo frente a una enfermedad en particular, sino también de las manifestaciones clínicas de ésta (Rocchi *et al.* 2003).

De manera que es plausible que en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el SC, la interacción gen-ambiente contribuya a la manifestación clínica, a la edad de comienzo y a la progresión de la enfermedad.

1.5.1. Importancia del gen *PRNP*

Se ha establecido la influencia del locus *PRNP* en la mayor o menor resistencia de los animales a padecer SC (Chesebro 1999; Hunter 1997). Numerosas investigaciones realizadas en los últimos años han permitido detectar una serie de posiciones polimórficas dentro de la secuencia del gen *PRNP* ovino. Como se presenta en la Tabla 2, más de una veintena de mutaciones dan lugar a cambios en la secuencia aminoacídica de la PrP.

Tabla 2. Polimorfismos en la secuencia de PrP.

Codón	101	112	116	127	136	137	138	141	143	151	154	167	168	171	172	174	175	176	180	189	195	196	211	241
Salvaje	Q	M	A	G	A	M	S	L	H	R	R	R	P	Q	Y	Q	Q	N	H	G	T	T	R	P
Variantes	R	T	P	A V S	V T	T	N R	F	R	G H C	H	S	L	R H K	D	E	E	K	T Y	L R	S	S	Q	S
alélicas																								

De todos estos polimorfismos, se ha prestado atención especial a los que afectan a los codones A136V, R154H y Q171RH, ya que está descrita su relación con la distinta resistencia/susceptibilidad de los ovinos a padecer SC natural. La combinación de estos polimorfismos da lugar a cinco alelos: ARQ, ARR, VRQ, AHQ, ARH. El haplotipo VRQ está asociado con una alta susceptibilidad a SC y el ARR con una elevada resistencia, teniendo este último un modo de acción génica dominante, ya que tanto los homocigotos ARR/ARR como los heterocigotos ARR/--- tienen un menor riesgo de padecer la enfermedad. La combinación de los 5 haplotipos da lugar a 15 genotipos diferentes (Tabla 3), los cuales, según la raza estudiada, pueden agruparse en función del grado resistencia o susceptibilidad que confieren frente al SC (Dawson *et al.* 1998).

Tabla 3 Clasificación de los diferentes genotipos utilizada en el plan nacional de SC de Reino Unido (The national SC plan administration centre, NSPAC, 2002), y adoptada por la UE (Decisión CE N° 1003/2002), es la siguiente

Genotipo	Estatus de SC	Tipo
ARR / ARR	Ovinos genéticamente más resistentes	1
ARR / AHQ, ARR / ARH y ARR / ARQ	Ovinos genéticamente resistentes pero que deben ser manejados con cautela en programas de mejora genética	2
ARQ / ARH, ARQ / AHQ, AHQ / AHQ, ARH / ARH, AHQ / ARH y ARQ / ARQ	Ovinos con escasa resistencia genética	3
ARR / VRQ	Ovinos genéticamente susceptibles y que no deben de usarse para la reproducción salvo excepciones controladas	4
AHQ / VRQ, ARH / VRQ ARQ / VRQ y VRQ / VRQ	Ovinos con elevada susceptibilidad genética y que no deben de usarse para la reproducción	5

Sin embargo, debido al desarrollo de las técnicas de detección de PrP^{sc}, en los últimos años se están descubriendo cada vez más casos de SC atípico. Éstos incluyen la cepa Nor98, identificada en 1998 en Noruega por sus inusuales características bioquímicas y patrón patológico, y casos que presentan resultados discordantes en las pruebas rutinarias que se utilizan en el muestreo de animales. El problema radica en que se han encontrado muchos de estos casos en ovejas con genotipos que, hasta ahora, se consideraban resistentes (Le Dur *et al.* 2005).

Por otra parte, puede que no sean sólo estas tres posiciones las responsables de la distinta respuesta a la enfermedad, sino que otras posiciones adicionales contribuyan a ella. Así, por ejemplo, se han descubierto 5 SNPs en regiones no codificantes del *PRNP* (intrón 2 y 3'UTR) asociadas con el nivel de expresión de RNAm en sangre (Willemarck *et al.* 2007) y se ha verificado la influencia en el periodo de incubación frente a Nor98 de la posición 141 (Goldmann *et al.* 2005).

I.5.2. Evolución del SC en España

La detección del número de focos de SC en España ha estado muy relacionada con la evolución del programa de vigilancia y control de estas enfermedades. Este programa, cuyo principal objetivo es proteger la salud pública, tiene como medidas detectar y eliminar los animales infectados de la cadena alimentaria. Al mismo tiempo permite conocer la prevalencia de la enfermedad y evaluar la eficacia de las medidas tomadas para su control (Monleón *et al.* 2006).

Desde mediados de 2002 se realizaron análisis a los ovinos y caprinos mediante muestreo aleatorio de animales mayores de 18 meses sacrificados para consumo, los muertos en explotación y los sacrificados no destinados a consumo. Como se indica en la Fig. 7, en el periodo 2000-2005 aparecieron un total de 107 animales positivos. Tal como indica la legislación, se procedió al sacrificio y destrucción de un total de 59.995 animales de aquellos rebaños afectados, evitando así su entrada en la cadena alimentaria.

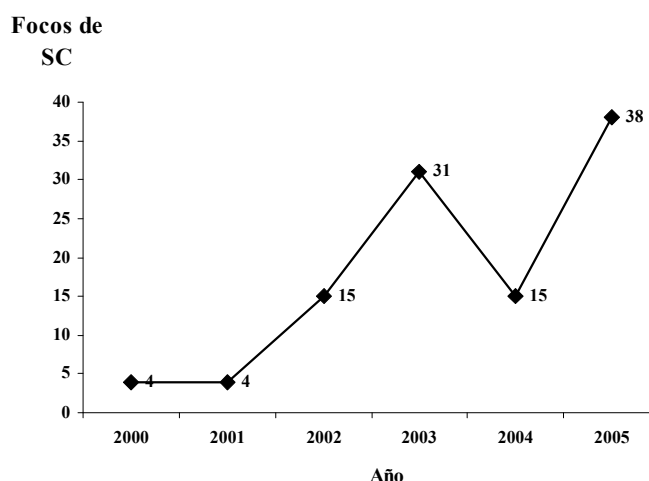


Fig. 7 Casos de SC detectados en el periodo 2000-2005 en España. El aumento de focos detectados en los años 2002-2003 se puede atribuir a un cambio en la legislación europea a mediados de 2002 que obliga a analizar, en el caso de España, 60.000 animales sacrificados para consumo humano y 6.000 animales muertos en las explotaciones. No obstante, en ese mismo año 2003, se publicó una nueva modificación legislativa según la cual se disminuía el número de animales a analizar para consumo humano (10.000) y se reforzaban los análisis de los animales muertos en explotación (10.000). Esta disminución en el número de análisis se acompañó de un descenso en el número de focos detectados en el año 2004. Finalmente, tal como puede observarse en la gráfica, en el año 2005 el número de focos de SC detectados volvió a ascender debido posiblemente a una nueva modificación en el muestreo de los caprinos (125.00 animales sacrificados para consumo humano y 10.000 muertos en explotación), como consecuencia de la aparición del primer caso de la EEB en la especie caprina

Numerosos países de la Unión Europea, entre ellos el nuestro, han desarrollado planes de erradicación del SC a través de la selección de animales portadores de genotipos de *PRNP* que confieren resistencia y la eliminación de genotipos sensibles. Sin embargo, actualmente y como conclusión a los trabajos realizados a lo largo de la última década, se puede afirmar que no existe un genotipo de *PRNP* que confiera resistencia total a SC, sino largos tiempos de incubación de la enfermedad que, como en el caso de los animales *ARR/ARR*, pueden ser confundidos con resistencia, ya que la vida media de estos animales no permite la aparición de los síntomas clínicos.

Además, como consecuencia de la selección de animales de genotipo resistente, parece que están aumentando los casos atípicos de SC. Así, en 2006, en España, se detectaron 96 casos de SC, de

los cuales el 65% eran de SC clásico, mientras que el 35% restante eran casos de SC atípico. Los análisis de genotipado y los estudios neuroanatómicos mostraron diferencias entre esos dos grupos. En el grupo de casos atípicos, la distribución genotípica fue la siguiente: 18% ARQ/ARQ, 21% ARQ/AHQ, 29% ARR/ARQ, 14% ARR/AHQ, 6% ARQ/ARH y 12% ARR/ARR, distinta de los casos clásicos donde el 92% de las muestras eran ARQ/ARQ (Huelamo *et al.* 2007).

I.5.3. Otros genes candidatos

Varias líneas de investigación han demostrado que las diferencias aminoacídicas en la PrP no son las únicas responsables de la distinta respuesta a la infección por priones. Trabajos realizados en líneas de ratones endogámicas con el mismo genotipo de *PRNP* han mostrado diferencias significativas en los tiempos de incubación de la enfermedad (Carlson *et al.* 1988; Dickinson 1975; Westaway *et al.* 1987). Adicionalmente, estudios recientes sobre la evolución de la infección, en un rebaño de raza Romanov afectado por una epidemia de SC natural (Diaz *et al.* 2005), sugieren la existencia de una fuente de variabilidad genética (21% de la variabilidad genética total), no debida al *PRNP* (o al menos a las mutaciones en los codones 136, 154 y 171 de dicho gen), asociada a las diferencias en resistencia/susceptibilidad a la enfermedad. De este modo, los mecanismos de resistencia genética a SC podrían ser explicados por el efecto conjunto de mutaciones puntuales en el gen *PRNP* y las existentes en un número indeterminado de genes (poligen) que modularían su efecto.

En este sentido, existen algunos trabajos de búsqueda de regiones QTL asociadas a la variabilidad en el tiempo de incubación a SC en los genomas murino (Lloyd *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2003b; Stephenson *et al.* 2000) y ovino (Moreno *et al.* 2003a). Estos estudios han permitido localizar, con diferentes grados de significación estadística, regiones QTL potenciales candidatas a contener genes implicados en las diferencias observadas en el periodo de incubación de la enfermedad, que en el caso del ratón se sitúan en los cromosomas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, y 17 y en la oveja en los cromosomas 3 y 18. Estas regiones en el genoma humano y murino contienen un gran número de genes que pueden constituirse en candidatos posicionales y funcionales en relación con el tiempo de incubación y los distintos grados de susceptibilidad a SC y por tanto, su futuro estudio constituye una de las grandes líneas de investigación en el área de las EETs.

II. OBJETIVOS

Existen fuertes evidencias que apoyan la idea de que la acumulación de agregados proteicos en el cerebro juega un papel fundamental en la neurodegeneración (Walsh y Selkoe 2004), y la opinión general es que las enfermedades neurodegenerativas no son el resultado de la acción de un solo gen, sino que son el resultado de un proceso complejo en el que están implicados eventos genéticos, epigenéticos, y ambientales; que actuando de forma conjunta, influyen en el riesgo y la presentación de la enfermedad (Bossy-Wetzel *et al.* 2004).

La investigación de las enfermedades neurodegenerativas de numerosas especies, desde varias disciplinas científicas, ha revelado la existencia de procesos moleculares que podrían estar relacionados con el desarrollo de las EETs. Estos van desde la expresión de genes implicados en procesos relacionados con la respuesta inmune, el stress y envejecimiento celular (Allen *et al.* 2005), hasta los mecanismos del equilibrio biodinámico de los conformeros proteicos (Malolepsza *et al.* 2005).

Grupos de investigadores de Estados Unidos (Stephenson *et al.* 2000), Gran Bretaña (Lloyd *et al.* 2001) y Francia (Moreno *et al.* 2003a) en modelos transgénicos murinos y en ovinos, mediante el barrido del genoma utilizando marcadores moleculares tipo microsatélite, han detectado, con elevada significación, regiones genómicas implicadas en el desarrollo del SC ovino. Estas regiones contienen un buen número de genes que por su función biológica podrían ser responsables de parte de la variabilidad observada en la duración del periodo de incubación del SC, al margen de la explicada por los polimorfismos clásicos del gen *PRNP* o en combinación con éstos.

Basándonos por tanto en los resultados obtenidos en las distintas líneas de investigación citadas anteriormente, los objetivos que se plantean en este trabajo son los siguientes:

- 1- Elección de genes candidato, alternativos al *PRNP*, que pudiesen estar implicados en la modulación del periodo de incubación y en la resistencia/susceptibilidad a SC en la especie ovina.
- 2- Aislamiento y caracterización de dichos genes
- 3- Búsqueda de marcadores polimórficos en los genes seleccionados que permitan su posterior localización cromosómica en el genoma ovino y el establecimiento de posibles relaciones entre estos genes y la distinta resistencia/susceptibilidad a SC.
- 4- Localización física y genética de los genes escogidos.
- 5- Estudio de asociación de algunos de los polimorfismos genéticos encontrados con la variable respuesta a la infección por SC

- 6- Estudio de expresión de los distintos genes en varios tejidos importantes en la propagación y desarrollo de la enfermedad.
- 7- Estudio funcional de la PrP^c en relación con alguno de los genes escogidos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS

La comprensión del control genético de los caracteres cuantitativos, como es la resistencia/susceptibilidad a SC, requiere el estudio de genes, de su estructura molecular, su posición y su función, es decir, de los procesos biológicos en los que participan. Como se ha explicado anteriormente en el apartado I.3., existen dos aproximaciones diferentes para el estudio de genes candidatos: la estrategia del gen candidato funcional y la del gen candidato posicional.

La estrategia del gen candidato consiste en centrar el trabajo en uno o varios genes elegidos según los criterios de función y posición, descritos anteriormente, y su estudio mediante la búsqueda de variantes genéticas que puedan explicar la variación fenotípica del carácter. Esta aproximación puede hacer uso de la información derivada del mapa genético de la especie de estudio (ovina) o bien de los análisis genómicos de especies modelo (humano y ratón), mediante cartografía comparativa. En el presente trabajo, se compararon las especies humana-bovina-ovina y humana-murina utilizando las webs: <http://rubens.its.unimelb.edu.au/%7Ejillm/jill.htm>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> y <http://www.ensembl.org/index.html>.

El mapeo comparativo se basa en la observación de que los grupos de genes estrechamente ligados en unas especies tienden a estarlo en otras. Aquí, la posibilidad de que el ligamiento o sintenia se conserve o se rompa, depende de las reordenaciones cromosómicas que se produjeran durante la divergencia de las especies, es decir, durante la evolución (Nadeau y Sankoff 1998). Generalmente, las especies más relacionadas, presentan un mayor grado de conservación genómica, de forma que se puede establecer la localización de genes ortólogos en distintas especies, pudiendo identificar y alinear los segmentos cromosómicos correspondientes. Los mapas comparativos permiten encontrar posibles genes candidatos a partir de genes ya descritos en otras especies, principalmente la humana.

La elección de genes candidatos también puede servirse de las nuevas metodologías, como los microarrays, que permiten el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes. Los genes que presentan evidencias significativas de expresión diferencial en relación con el carácter de interés podrían ser considerados genes candidatos (Wayne y McIntyre 2002).

A fin de elegir los genes a estudiar, se han tenido en cuenta estudios de QTLs (Lloyd *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2003a; Moreno *et al.* 2003b; Stephenson *et al.* 2000), de expresión (Dandoy-Dron *et al.* 1998; Diedrich *et al.* 1993; Duguid *et al.* 1989; Riemer *et al.* 2000; Xiang *et al.* 2004), así como de interacción de PrP con otras proteínas (Gauczynski *et al.* 2001a).

III.2. ANIMALES Y MATERIAL BIOLÓGICO

III.2.1. Animales

III.2.1.1. Ovinos

III.2.1.1.1. Búsqueda de polimorfismos

La identificación de polimorfismos en los genes elegidos se llevó a cabo en un panel de animales en el que estaban representadas las razas ovinas Manchega, Rasa Aragonesa, Awassi, Assaf y Latxa. De este modo se intentaba evitar la posible fijación alélica debida a las estrategias de selección llevadas a cabo en las distintas razas, así como de encontrar polimorfismos representativos a nivel de especie.

Por otra parte, animales de las razas Manchega y Assaf, de genotipo de *PRNP* ARQ/ARQ se genotiparon con el fin de comprobar que las frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en el estudio de asociación (III.2.1.1.4.) no eran exclusivos de la raza Rasa Aragonesa, sino que presentaban una distribución similar en otras razas.

III.2.1.1.2. Cartografiado genético

Los genes estudiados se cartografiaron genéticamente con el panel internacional de familias de referencia de ganado ovino que está compuesto por 127 animales (3 generaciones de 9 familias de hermanos completos) pertenecientes al AgResearch de Nueva Zelanda. Las razas Texel, Coopworth, Perendale, Romney y Merina contribuyeron a la generación de los pedigrees según se describe en Crawford *et al.* 1995.

III.2.1.1.3. Estudio de expresión

En el presente trabajo se han analizado los cambios relativos en los niveles de ARNm de los genes *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN* en bazo y cerebelo en 13 ovejas de raza Rasa Aragonesa. Todas ellas eran hembras con igual genotipo de *PRNP* (ARQ/ARQ) y de edades comprendidas entre 3-5 años. Ocho de ellas pertenecían al rebaño del programa español de supervivencia de SC y exhibían signos clínicos de la enfermedad en estado terminal. Los animales control procedían de un rebaño diferente en el que no se había detectado ningún caso de SC.

III.2.1.1.4. Análisis de asociación

Los genotipos de *PRNP* que son más o menos susceptibles al SC varían en función de la raza. Así, según la raza que se esté considerando, el genotipo ARQ/ARQ muestra distinta resistencia a la infección (Baylis *et al.* 2004). Sin embargo, no se ha podido establecer que esa diferencia se deba a otras mutaciones diferentes a las que afectan a los aminoácidos en las posiciones 136, 154 y 171 (Goldmann *et al.* 2005).

De modo que, para determinar posibles mutaciones, en los genes elegidos, que pudieran estar relacionadas con la distinta resistencia/susceptibilidad a SC observada en ovino, se estudió una muestra de 85 ovejas pertenecientes a seis rebaños de la raza Rasa Aragonesa, conservados por el Centro de Investigación de Priones de la Universidad de Zaragoza, en los que se habían detectado casos de SC natural. Todas ellas eran adultas y poseían igual genotipo de *PRNP* (ARQ/ARQ). Un total de 34 ovejas (enfermas) estaban infectadas y exhibían los signos clínicos e inmunohistoquímicos característicos de la enfermedad. Las restantes 51 (sanas), a pesar de pertenecer a rebaños afectados por la enfermedad, no mostraban ninguno de estos rasgos.

III.2.1.2. Ratones

En la actualidad, los ratones siguen siendo el principal modelo animal en experimentación, debido, entre otras cosas, a su fácil manejo y al gran conocimiento que se tiene de su genética y embriología. Poseen un genoma manipulable prácticamente a voluntad, lo que permite estudiar la función fisiológica de genes de mamíferos.

Para comprobar si la enfermedad causaba cambios en los niveles de LRP/LR, así como para intentar dilucidar la existencia de un posible papel funcional que involucrase a LRP/LR y PrP^c, se emplearon ratones de líneas consanguíneas 129/ola y FVB, que no han sufrido ningún tipo de modificación genética (ratones *wilde type*), ratones que carecían del gen *PRNP* (ratones *KO*) (Bueler *et al.* 1993) y ratones que expresan unas diez veces más PrP que los ratones *wilde type* (ratones *Tga20*) (Fischer *et al.* 1996).

III.2.1.3. Conejos

Se utilizó únicamente el bazo procedente de un conejo Neozelandés blanco proporcionado por la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, con la intención de secuenciar el RNAm del gen *RPSA* y deducir, a partir de éste, la secuencia aminoacídica del LRP/LR cunícola.

III.2.2. Genoteca de Cromosomas artificiales bacterianos (BACs)

El cartografiado citogenético de los cuatro genes elegidos, así como la obtención de parte de la secuencia de éstos, se realizó empleando la genoteca de BACs ovinos del INRA-CRJ (Jouy-en-Josas, France) creada según se describe en (Vaiman *et al.* 1999). Ésta contiene más de 3 veces la totalidad del genoma ovino repartido en 90.000 clones almacenados en placas de 96 pocillos.

III.2.3. Cultivos celulares

En los últimos años, los cultivos celulares han permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en muchos procesos intra e intercelulares. Éstos están siendo muy utilizados fundamentalmente porque, en comparación con los modelos animales, permiten obtener resultados de forma rápida y económica.

En este trabajo se utilizaron cultivos de neuroesferas (NF) y de células madre embrionarias (NSC). Las NF son agregados multicelulares constituidos por una mezcla de NSC y otros progenitores neurales más diferenciados, donde sólo el 3-4% de las células que conforman la NF son células madre multipotentes. Las NSC, por su parte, son células que mantienen indefinidamente la capacidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Glaser *et al.* 2007).

Es de destacar que los cultivos en suspensión inducen agregación y diferenciación, sin embargo, la complejidad de los distintos tipos celulares presentes en los cultivos de NF puede eliminarse al pasar a cultivos de células adherentes. De forma que, una vez pegadas, las NSC pueden autoregenerarse, sin sufrir apenas diferenciación (Fig. 8).

Las NF se generaron a partir de cerebros de embriones de ratón de 14 días, de las cuatro líneas murinas anteriormente descritas (129/ola, FVB, KO y Tga20). Los cultivos de NSC se establecieron disgregando cultivos de NF y pasando las células a placas cuya superficie estaba recubierta con poliornitina/fibronectina.

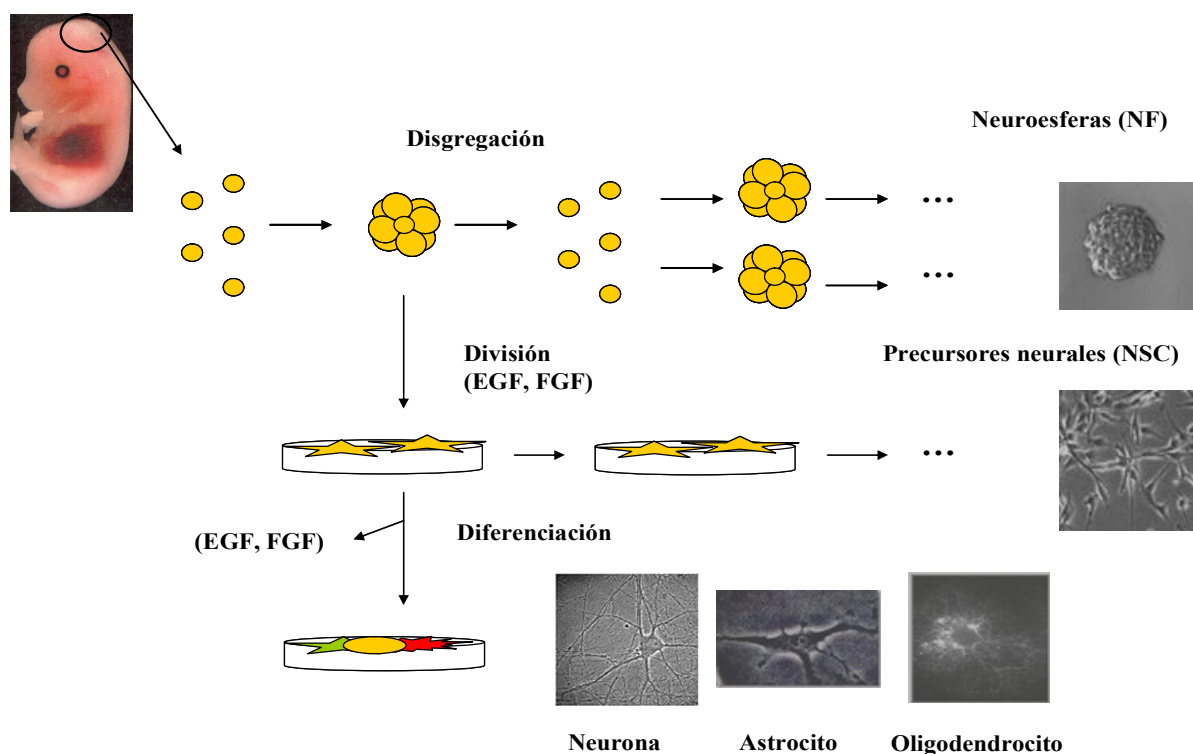


Fig. 8. Generación de NF, NSC y otras tipos celulares a partir de cerebros de fetos de ratón.

En ambos casos, los cultivos se mantenían en medio de división N2 suplementado con 20ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y 20ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF). La diferenciación se inducía retirando los factores de crecimiento en medio NBB27.

En todos los casos la incubación se hacía a 37°C y con una saturación de CO₂ del 5%.

También se utilizaron NF con expresión de PrP regulada por doxíciclina (K1). Éstas fueron generadas a partir de células KO para el gen *PRNP*, anteriormente descritas, que se transfectaron con una construcción que permitía expresar la PrP^c, de manera condicional, regulada de forma dosis dependiente con doxíciclina (Ginés *et al.* sin publicar).

N2: DMEMF12, factores N2, aminoácidos no esenciales, HEPES, penicilina/streptomina, 2% Albumax (Gibco), 12% glucosa (Sigma)

NBB27: Neurobasal (Gibco) con suplementos B27 (Gibco), L-glutamina (Biowithaker) y aminoácidos no esenciales

III.3. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

III.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

III.3.1.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de linfocitos ovinos de sangre periférica, recogida con el anticoagulante EDTA, según la metodología del “*Salting out*” (Miller *et al.* 1988). Si las muestras no estaban bien limpias, se realizaba una purificación con fenol cloroformo. Tras la extracción y purificación el ADN era cuantificado (ver apartado 2.1.7).

III.3.1.2. Extracción de ARN mensajero (ARNm)

El ARNm se extrajo de muestras de bazo y cerebelo homogeneizadas en RNA later (Ambion) y almacenadas a -80°C . La lisis tisular y la extracción del ARNm de bazo se realizó con el Rnasy Protect Mini Kit (Quiagen). Para la extracción del ARNm de cerebelo se empleó el Rnasy Lipid Tissue mini kit (Quiagen), que añade un paso previo que facilita la lisis de tejidos ricos en lípidos. Las trazas de DNA genómico se eliminaron usando Dnasa RNase-Free Dnase set (Quiagen). El resultado de la extracción se comprobó como se describe en el apartado III.3.3.1..

III.3.1.3. Extracción del ADN de BAC

El ADN del BAC se extrajo mediante la metodología denominada Maxiprep, que es una metodología derivada del protocolo de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979). La purificación del ADN del BAC se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico con el kit NucleoBond PC 100 (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.2. Diseño de cebadores

Los cebadores son secuencias de entre 17-24 pb que se emplean en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que se describen en el siguiente apartado. Para diseñarlos, el primer paso fue buscar en la red (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) secuencias de los genes candidatos a estudiar y ver si la secuencia del gen de interés estaba descrita en la especie ovina.

En caso contrario, los cebadores se diseñaron en las regiones más conservadas entre humano, bovino y murino.

Se emplearon los programas informáticos “Primer3” (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), “QUICKPRI”, que forma parte del paquete informático Winstar y el “Primer Express” de Applied Biosystems. Estos programas tienen en cuenta varios parámetros como el tamaño de los oligonucleótidos, o la formación de dímeros y/u horquillas, con el fin de conseguir la óptima amplificación del fragmento de interés. En algunas ocasiones, cuando las condiciones eran demasiado restrictivas como para que estos programas pudieran proceder, fue necesario diseñar los cebadores manualmente. En estos casos, la formación de estructuras secundarias entre los oligonucleótidos diseñados fue comprobada con los programas “Netlunch Primer” (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) y “OligoAnalyzer” (<http://www.idtdna.com/analyzerA/pplications/OligoAnalyzer/Default.aspx>), disponibles en la red.

III.3.3. Amplificación de ácidos nucleicos

III.3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR ha sido la técnica más utilizada en este trabajo. Esta técnica, sirviéndose de enzimas y una serie de repeticiones de ciclos de temperatura, permite la amplificación específica de fragmentos de ADN o ADNc. En los artículos a los que ha dado lugar este trabajo (Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a; Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b; Marcos-Carcavilla *et al.* accepted), se detallan las parejas de cebadores y las condiciones utilizadas en cada caso.

III.3.3.2. Retrotranscripción y amplificación de ARN (RT-PCR)

El ARNm extraído según se indica en el apartado III.3.1.2., se empleó como molde para la síntesis del ADN complementario (ADNc). La retrotranscripción (RT) de las muestras ovinas (III.2.1.1.3.), se realizó con el kit SuperScript síntesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En el caso de la muestra de conejo, la RT se llevó a cabo como se indica en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted.

III.3.4. Visualización de ácidos nucleicos en gel de agarosa

III.3.4.1. Visualización de ADN en gel de agarosa

El ADN fue analizado (talla y concentración) mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de distintas concentraciones (1-4%), según el tamaño esperado del fragmento a observar. Las muestras se migraron en compañía del marcador BioMarker® Extended Plus (Bioventures); que además de permitir cuantificar el tamaño de los fragmentos, también permite estimar la concentración de las muestras.

III.3.4.2. Visualización de ARN en gel de agarosa

Con el fin de confirmar el éxito de la extracción de ARNm, éste era desnaturalizado con una solución de formamida y visualizado en geles de agarosa al 1%.

III.3.5. Purificación de productos de PCR

A fin de evitar que la presencia de sales, enzimas, nucleótidos, cebadores y otros componentes derivados de la amplificación por PCR pudieran interferir en el proceso de secuenciación, la purificación de los productos de PCR se realizó utilizando distintos kits comerciales: GFX PCR DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) y KIT EXOSAP-IT (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

III.3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN, ARNm, ADNc y productos de amplificación de PCR se cuantificaron con la ayuda de un espectrofotómetro y/o en geles de agarosa al 1% (apartado III.3.3.1)

III.3.7. Secuenciación y análisis informático de las secuencias

Los fragmentos purificados del gen fueron enviados a secuenciar a distintos centros (Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid; SEGUGEN, Madrid; y al servicio de secuenciación del CISA, Madrid).

Una vez recibidas, las secuencias eran analizadas, mediante diversos programas informáticos, con el objetivo de editarlas y ensamblarlas, corroborar que se trataba del gen de interés, buscar polimorfismos, así como de estudiar diferentes características de su secuencia. Los programas informáticos utilizados han sido:

- Lectura de secuencias:
Chromas 1.43
- Alineamiento de secuencias:
ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
BLAST 2seq: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>
- Estudios de homología:
BLAST del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
BLAT: (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>)
ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>).
- Búsqueda de motivos de secuencias:
TF search: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
SignalScan: <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal/>
RGSiteGroupScanprogram: <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/yura/yura.exe>
- Predicción de la secuencia aminoacídica a partir de la secuencia nucleotídica:
ORF finder: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>
Translate tool: (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>)

III.3.8. Análisis de polimorfismos

Una vez identificados los polimorfismos, se verificaba si alguna de sus variantes producían algún cambio en posibles regiones reguladoras del gen o en la secuencia aminoacídica en la proteína.

El programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) se utilizó para determinar la presencia de dianas de restricción polimórficas que permitieran el genotipado de los distintos alelos a través de la metodología de PCR-RFLP.

Por otro lado, se trató de determinar, de forma teórica, si los cambios aminoacídicos generados tenían alguna manifestación en la estructura secundaria de la proteína y por tanto alguna implicación funcional. Para ello se utilizaron los programas de simulación de estructuras secundarias PsiPred y SSCP, disponibles en la red (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> y http://coot.embl.de/cgi/sscp_serv.pl, respectivamente), el programa de búsqueda de dominios,

SMART, que está basado en la comparación con dominios presentes en las bases de datos (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y el programa SIFT de predicción de cambios más o menos permitidos (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>).

En Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a; Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b; Marcos-Carcavilla *et al.* accepted se detalla la metodología desarrollada para genotipar los polimorfismos analizados en este trabajo.

III.4. CARTOGRAFIADO DEL GEN

La localización de los genes estudiados se llevó a cabo mediante dos aproximaciones: cartografiado genético y cartografiado físico.

III.4.1. Cartografiado Genético: CRIMAP

El cartografiado genético o de ligamiento consiste en posicionar el/los locus/loci de interés entre marcadores o genes, ya descritos y localizados, basándose en el análisis de las tasas de sobrecruzamiento o recombinación.

De este modo, empleando la información del genotipado de polimorfismos detectados en cada uno de los genes objeto de estudio, junto con la aportada por el conjunto de marcadores caracterizados en los animales pertenecientes a las familias de referencia descritas en el apartado III.2.1.1.2., permitió inferir la posición más probable de los genes, relativa al resto de marcadores ya cartografiados.

Se empleó el programa estadístico CRI-MAP 2.4 (Green *et al.* 1990), que utiliza la información de dos marcadores (opción Two-point) o de todos los marcadores (opción Multi-point) para la elaboración de los mapas genéticos bajo la función de mapeo de Kosambi, que permite ubicar nuevos marcadores en el mapa en relación a los marcadores previamente posicionados, mediante la metodología de máxima verosimilitud.

III.4.2. Cartografiado Físico: Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH)

Las técnicas de hibridación *in situ* permiten visualizar la unión de secuencias nucleotídicas específicas (sondas) sobre cromosomas, así como sobre cortes de células y tejidos. Es la manera más precisa y directa de localizar un gen o toda una secuencia sobre un cromosoma. Esta técnica está ligada a dos imperativos: por una parte la localización de la señal producida por la sonda hibridada y, por otra, la identificación de los cromosomas que portan la señal. Cuando la señal producida es fluorescente se denomina FISH (del inglés, *fluorescent in situ hybridization*)

En este trabajo, el cartografiado físico del gen se llevó a cabo mediante FISH empleando como sondas los BACs descritos en los apartados IV.1.2.2., IV.3.2.2, IV.4.2.2 y IV.5.2.2. Estos BACs se encuentran repartidos en 90.000 clones almacenados en placas de 96 pocillos.

A su vez, esta librería está organizada en 39 grupos o “supermezclas” (SM) de 24 placas (39 x 24 = 936 placas). Cada SM contiene 24 x 96 = 2304 clones.

Paralelamente, cada SM se organiza en un esquema de tres dimensiones: 1º) Veinticuatro mezclas que contienen cada una la totalidad de los 96 clones de cada placa. 2º) Ocho mezclas de línea (de A a H) conteniendo cada uno la mezcla de las líneas de las 24 placas (12 x 24 = 288 clones). 3º) Doce mezclas de columnas (de 1 a 12) conteniendo cada uno la mezcla de cada una de las columnas de las 24 placas (8 x 24 = 192 clones).

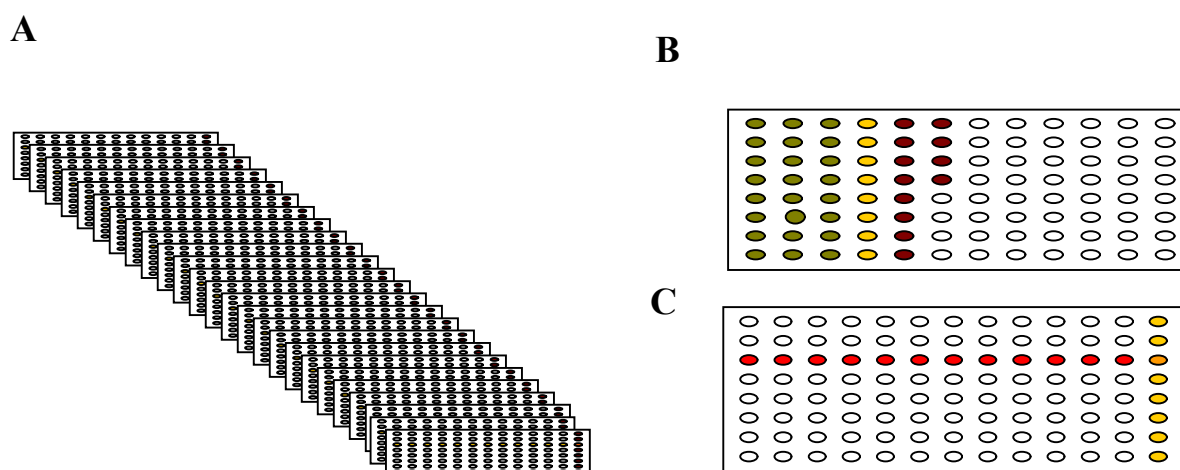


Fig. 9 A) Esquema de los 24 clones que forman una SM. B) Representa el procedimiento para la elaboración de las placas que contienen los pocillos necesarios para la localización del clon tras saber la SM en la que se encuentra. En cada pocillo verde está la mezcla de 96 pocillos correspondiente a cada una de las 24 placas; en cada pocillo amarillo está la mezcla de 288 pocillos resultantes de cada una de las mezclas de línea (C rojo); en cada uno de los pocillos rojos está la mezcla de 192 pocillos resultantes de cada una de las mezclas de columna (C amarillo).

III.4.2.1. Cribado de la genoteca por PCR

Con el fin de conocer la posición exacta del clon portador del BAC de interés en el interior de la genoteca se realizaron PCRs en dos turnos:

1º-Identificación del supermezcla (SM)

Se hizo una PCR sobre el ADN de las 39 SM. Aquellas en las que se observó amplificación contenían el clon con el gen de interés.

2º- Identificación de la dirección del clon en la placa correspondiente

La segunda PCR se realizó sobre una placa, previamente preparada para cada SM, siguiendo el esquema de tres dimensiones descrito anteriormente (apartado 2.2.2). El resultado obtenido se componía de tres bandas: la primera de ellas indicaba en cual de las 24 placas de la SM se encontraba el clon; la segunda en cual de las 8 filas (posición de A a H) y la tercera en cual de las 12 columnas (posición de 1 a 12). Con estos tres datos se pudo inferir la dirección exacta del clon en el interior de la genoteca mediante el siguiente procedimiento:

Hay 39 SM con 24 placas cada una. En cada una de las placas hay 96 posibles localizaciones. Las 8 primeras localizaciones se corresponden con la fila y las 12 siguientes con la columna en la que se encuentra.

$\text{N}^\circ \text{ placa en el interior de la genoteca} = (\text{SM}-1) \times 24 + \text{n}^\circ \text{ placa positiva}$

La dirección del clon será: Placa + fila + columna

Una vez conocida la localización del clon en el interior de la genoteca se procedió a la extracción de su material genético siguiendo la metodología descrita en el apartado III.3.3.1.

III.4.2.2. Hibridación In Situ Fluorescente

Las sondas fueron preparadas a partir del ADN del BAC siguiendo el protocolo de “Nick translation” descrito por Langer y cols. (1981). Éstas se hibridaron sobre preparaciones de metafases ovinas siguiendo el protocolo descrito por Hayes y cols. (1991).

III.5. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Tanto las mutaciones puntuales como las grandes mutaciones tipo sustituciones, eliminaciones, inserciones o duplicaciones en un determinado gen, incluyendo regiones promotoras y reguladoras, pueden generar cambios en la composición aminoacídica, provocar fenómenos de splicing alternativo, o bien originar la aparición de codones *stop*, provocando cambios en la estructura y funcionalidad de las proteínas, que pueden resultar cruciales para el proceso biológico en el que participan.

En este trabajo, se han secuenciado y comparado distintas regiones que pudieran tener influencia en la cantidad final de los productos génicos de los cuatro genes en estudio (promotores y posibles regiones reguladoras), así como en algunas regiones que se cree pudieran tener gran relevancia funcional a la hora de facilitar la entrada de los priones en la célula (región de LRP/LR implicada en la interacción con PrP^c/PrP^{sc}, vease apartados IV.1.7., IV.3.4. y IV.4.4. En el apartado III.7.2. se describe el procedimiento estadístico utilizado para relacionar los distintos polimorfismos encontrados con la mayor o menor resistencia a la infección por SC.

III.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN

Hay distintas técnicas para estudiar la expresión de un gen. En este trabajo se han empleado las técnicas de PCR en tiempo real y *western blot*, que serán descritas a continuación.

III.6.1. PCR a tiempo real

A diferencia de la PCR convencional, la PCR a tiempo real, o PCR cuantitativa, permite monitorizar el transcurso completo de la reacción de PCR, mediante la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción que es indicativa de la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de la PCR.

El proceso se realizó con un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Este termociclador va acompañado de un software que permite cuantificar fácilmente la cantidad de material genético de interés al inicio de la reacción, tomando como referencia patrones de concentraciones seriadas que se amplifican al mismo tiempo que las muestras a analizar.

Cuando se cuantifica la expresión de un gen, para disminuir el posible error generado en pasos previos, se utilizan genes de referencia, normalizadores de los resultados, que suelen ser genes de mantenimiento (HK, del inglés, *housekeeping gene*), que no varían su expresión en las situaciones a analizar. En el presente trabajo, siguiendo las indicaciones de García-Crespo (2005), se han empleado dos HK específicos para cada uno de los tejidos analizados: SADH y GAPDH en bazo y G6PDH y 18S en cerebelo.

Las parejas de cebadores, las sondas y las distintas condiciones específicas de cada reacción se detallan en (Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a; Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b; Marcos-Carcavilla *et al.* accepted).

III.6.2. Western Blot

El *western blot* es uno de los métodos más utilizados para el análisis de proteínas. Esta técnica emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta que se representa en la Fig. 10.

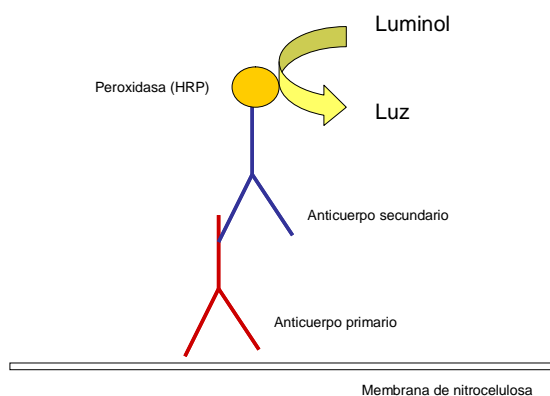


Fig. 10 Esquema ilustrativo de la detección de proteínas por Western blot

Según este procedimiento, un anticuerpo primario se utiliza para localizar la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, que reconoce la especie en la que se ha producido el primero, se emplea para localizar dónde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario suele estar marcado con el fin de producir una señal detectable.

Así, en primer lugar, los distintos tipos de muestras fueron tratados con tampón de lisis triton/doc (0,5% deoxicolato sódico, 0,5% Tritón X-100, 150mM NaCl, Tris 50mM pH 7.5) con inhibidores de proteasas, como se indica en la Tabla 4. La cantidad de proteína total fue

determinada mediante el BCA-200 Protein assay reagent kit 23225ZZ, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 4. Tipos de muestra analizados por *western blot* en relación al tratamiento con el buffer de lisis

Tipo de muestra	Tratamiento con tampón de lisis triton/doc
Cerebros de ratón ^a	100µl de muestra en 300 µl de tampón
Precipitados de cultivos flotantes	El precipitado se resuspendía en 100-300 µl de tampón
Cultivos celulares crecidos en placa	Las células se recogían directamente en 150-250 µl de tampón
Sobrenadantes	17 µl de sobrenadante previamente centrifugado a 2000g 5' sin tampón

^a homogeneizados de cerebros de ratón (175 ± 20 mg) que habían sido preparados en una solución de glucosa al 5% en agua destilada en tubos de trituración siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial (Bio-Rad)

A continuación, entre 10-20 µg de proteína total con tampón de carga 4X SDS se hervían durante 10 min. Para detectar la presencia de PrP^{sc}, las muestras eran previamente tratadas con 10 µg/mg PK (Roche) a 37°C durante 30 min. Seguidamente, las muestras se migraban en geles SDS-PAGE al 12% para separar las proteínas. Posteriormente, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel, éstas eran electrotransferidas a membranas de inmóvilon (Millipore). Tras el bloqueo, que pretendía prevenir posibles inespecificidades, se procedía a la hibridación de las membranas con los anticuerpos pertinentes (Tabla 5). Los anticuerpos secundarios empleados estaban marcados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que permitían su detección al ser revelado con ECL (Amersham).

Finalmente, tras eliminar el sistema de anticuerpos, las membranas eran reutilizadas para detectar la cantidad de β-actina, que se empleaba como control de la cantidad de muestra cargada.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados según las proteínas a analizar

Proteína	Bloqueo	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
37 kDa LRP	10% suero de caballo en leche	H141 (Santa Cruz)	1:500-1000	Goat α-rabbit (SantaCruz)	1:3000
67 kDa LR	5% de leche desnatada en PBS -0,1% Tween-20	α-67 kDa (Novus Biological)	3:5000	Goat α-rabbit (SantaCruz)	1:3000
PrP	2% BSA en PBS.	SHA-31 (Un regalo de J. Grassi)	1:2000	Goat α-mouse (Amersham)	1:2000
β-actina	5% de leche desnatada en PBS -0,1% Tween-20	α β-actina (Sigma)	1:5000	Goat α-mouse (Amersham)	1:200

III.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

III.7.1. Análisis de expresión por PCR cuantitativa en cerebelo y bazo

Los resultados de expresión, una vez normalizados, fueron analizados para determinar la existencia o no de diferencias en la expresión génica entre ovejas sanas y enfermas de SC en cerebelo y bazo. La comparación de las medias de dos muestras (animales sanos y enfermos) se realizó mediante una prueba t, en la que la hipótesis nula fue la igualdad entre las medias y la alternativa la diferencia entre éstas. Puesto que la prueba t asume la igualdad de las desviaciones típicas de las muestras analizadas, fue necesario determinar previamente, mediante una prueba F el cumplimiento de esta condición. A su vez, la prueba F de comparación de desviaciones típicas asume la normalidad de las distribuciones de origen los datos. Por ello, previamente a dicha prueba, se constató, mediante el análisis de los valores estandarizados de kurtosis y asimetría, el cumplimiento de dicha asunción. En todos los casos, se consideró como valor umbral de probabilidad el 5% ($p < 0.05$), de modo que valores de p inferiores indicarían el rechazo de la hipótesis nula a favor de la alternativa en todas las pruebas mencionadas.

III.7.2. Análisis de asociación de los polimorfismos y la presencia/ausencia de la enfermedad

El análisis de asociación entre los polimorfismos detectados en las distintas regiones de los genes estudiados y la presencia/ausencia de enfermedad, se llevó a cabo mediante un procedimiento estadístico adecuado al tratamiento de variables categóricas o de respuesta (sano y enfermo). Para ello se utilizó el procedimiento CATMOD del paquete estadístico SAS (SAS 1998), que es una metodología utilizada para la modelización de datos categóricos que pueden ser representados en una tabla de contingencia. Este procedimiento permite ajustar modelos lineales a las funciones de frecuencia de respuesta. Como en este caso sólo había dos niveles de respuesta (enfermo y sano) y una variable predictora (el genotipo del individuo para el/los polimorfismo/s del gen en estudio), la función standard de respuesta utilizada fue la denominada Generalized Logit (GL). Donde $GL = \log(p_j/pr) = \log(p_j) - \log(pr)$ para $j = 1, \dots, r-1$, $r =$ número de categorías de respuesta, para cada muestra i , $i = 1, \dots, s$, $s =$ número de genotipos.

La estima de la probabilidad de la respuesta j para cada muestra i (p_{ij}) viene dada por la fórmula:

$$p_{ij} = n_{ij}/n_j$$

donde, n_{ij} es el número de observaciones de la celda ij y n_j es el sumatorio de las observaciones de todas las celdas de la fija i . El método de estimación utilizado fue el de Máxima Verosimilitud (ML) con el algoritmo iterativo de Newton Raphson, el criterio de convergencia igual a 10^{-8} y un máximo de 100 iteraciones.

El estadístico de Wald (Chi.cuadrado) fue el utilizado para el contraste entre las hipótesis nula; no asociación entre la presencia/ausencia de enfermedad y el genotipo y la hipótesis alternativa (asociación entre la presencia/ausencia de enfermedad y el genotipo), siendo el valor de $p = 0.05$, el umbral de significación establecido.

IV. RESULTADOS

IV.1. ANÁLISIS DEL GEN *RPSA*

La proteína comúnmente conocida como receptor de laminina (LRP/LR), es en realidad una proteína ribosomal (proteína ribosomal SA) que, durante la evolución de los vertebrados, adquirió la función de receptor de laminina gracias a la aparición de la secuencia palindrómica LMWWML, en la región C-terminal de la misma (Ardini *et al.* 1998). Se han descrito dos isoformas de este receptor correspondientes a distintos estados de maduración de esta proteína. El precursor del receptor de laminina de 37kDa (LRP) y la isoforma madura de 67kDa (LR) (Shmakov *et al.* 2000). Hay varias teorías que intentan explicar el proceso por el cual LRP da lugar a LR. La hipótesis más plausible es la que propone que la forma madura se origina por la asociación de LRP con moléculas de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Hundt *et al.* 2001). Con respecto a su función, esta proteína interviene en varios procesos celulares. Así, LRP, asociado con la subunidad ribosomal 40S, forma parte de la maquinaria de traducción (Auth y Brawerman 1992), y, en el núcleo, participa en el mantenimiento de la estructura nuclear estabilizando la cromatina (Kinoshita *et al.* 1998). Por otra parte, la isoforma de 67kDa puede encontrarse en la membrana celular como receptor de laminina (Rabacchi *et al.* 1990), interviniendo en funciones de adhesión, movimiento, crecimiento y diferenciación celular (Gauczynski *et al.* 2001a) o libre en la matriz extracelular (Karpatova *et al.* 1996).

A pesar de no existir hasta el momento ningún estudio que relacione la región cromosómica en la que se encuentra el gen que codifica esta proteína (*RPSA*) con la resistencia/susceptibilidad a las enfermedades priónicas, es elevado el número de trabajos que apuntan hacia *RPSA* como un posible candidato funcional, ya que se ha demostrado la implicación del LRP/LR, no sólo en el metabolismo de PrP^c, sino también en la propagación de PrP^{sc} (Adjou *et al.* 2003; Gauczynski *et al.* 2001b; Horonchik *et al.* 2005; Hundt *et al.* 2001; Leucht *et al.* 2003; Morel *et al.* 2005; Rieger *et al.* 1997; Vana y Weiss 2006); Gauczynski *et al.* 2001b Morel *et al.* 2005; Gauczynski *et al.* 2006) y en el proceso de neurodegeneración (Balaoui *et al.* 2004).

IV.1.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen *RPSA* en la especie ovina

Estudios llevados a cabo en otras especies señalan que la proteína LRP/LR esta codificada por un único gen (*RPSA*). Sin embargo, el aislamiento y posterior secuenciación, así como el cartografiado del mismo, se han visto enormemente dificultados debido a la presencia de un elevado número de pseudogenes (unos 70 en la especie humana).

Con el fin de aislar y secuenciar el gen *RPSA* ovino se diseñaron 21 cebadores heterólogos, derivados de las secuencias humanas, HSU43901 y BC071968, y bovinas, NW_930073 y BC102490, depositadas en la base de datos del GenBank.

De este modo se estableció la secuencia de varios fragmentos del gen (intrón1-exón3, exón 4-exón 7) que permitieron diseñar una pareja de cebadores adecuada para llevar a cabo el cribado de la genoteca de BACs ovinos del INRA (apartado III.4.2.1.), así como la búsqueda de polimorfismos (apartados III.3.7. y III.3.8.), que sirvieron para llevar a cabo el cartografiado genético (apartado III.4.1.). Estas regiones están incluidas en la secuencia EF394773 que fue depositada en la base de datos del GenBank.

IV.1.4. Cartografiado del gen

IV.1.4.1. Cartografiado genético

La transición C/T, encontrada en la posición 69 del exón 6, fue analizada en las familias de referencia del AgResearch (apartado III.2.2. y III.4.1.). Para ello, se llevó a cabo una PCR con cebadores que hibridaban con los exones 5 y 6. El producto de amplificación estaba constituido por 275 pb que al ser digeridas con el enzima de restricción *AvaII* (New England BioLabs) originaban, en función el nucleótido situado en la posición 69, el siguiente patrón de bandas: el alelo C daba lugar a 3 fragmentos (199, 71, 5 pb), mientras que el alelo T daba lugar a 2 bandas (270 y 5 pb). Los cebadores y las condiciones requeridas se detallan en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted.

El análisis de ligamiento, realizado mediante el programa estadístico CRIMAP 2.4 bajo la opción multipoint, posicionó el gen en el cromosoma 19 ovino, entre los marcadores CSSM06 y -2HF3B, a una distancia de 3,3 y 8,1 cM respectivamente (Fig. 12), con un valor del logaritmo en base 10 de la verosimilitud de -202,528.

IV.1.4.2. Cartografiado citogenético

IV.1.4.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen RPSA ovino

Se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre las 39 SMs con una pareja de cebadores que hibridaban con el intrón 4 (ver apéndice 1 de Marcos-Carcavilla *et al.*, accepted) y se obtuvieron varios resultados positivos: SM8, SM9, SM10, SM18 y SM19 (Fig. 11). A continuación, se realizó una nueva PCR para obtener la dirección exacta de los clones siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.4.2.1. En un principio se analizó la M9. Sin embargo, ésta contenía 2 clones (ver flechas blancas) y por tanto, deducir la localización de éstos iba a resultar difícil. De este modo se procedió al análisis de las M8 y M18. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Para la realización del FISH y el aislamiento del gen, se extrajo sólo el DNA del BAC 177E6 según se indica en los apartados III.3.1.3. y III.4.2.2.

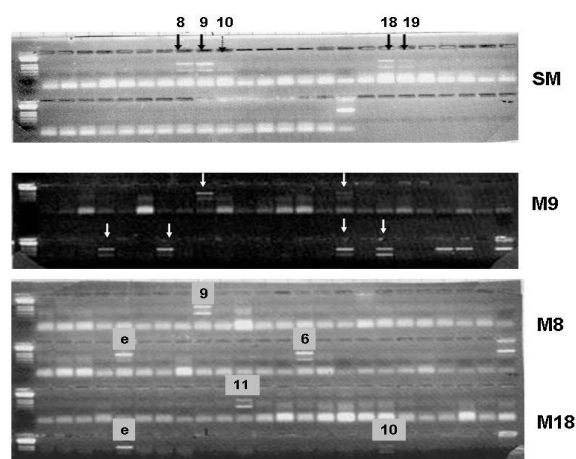


Fig. 11 En la parte superior se muestra la PCR con la que se identificaron las SMs positivas. A continuación, los resultados del análisis de la M9. Las flechas blancas indican las bandas correspondientes a los clones que contenían la región del intrón 4. Las otras tres bandas que aparecen son controles de la PCR. Abajo se muestran los resultados de la amplificación correspondientes a las M8 y M18. Según esto, la posición exacta del gen dentro de la genoteca es la siguiente: para la SM8 [(8-1)x24+9/E/6] = 177E6 y para la SM18 [(18-1)x24+11/E/10] = 419E11.

IV.1.4.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC

Primeramente, y para comprobar que el BAC 177E6 era el correcto, se secuenciaron los extremos del inserto usando primers específicos del vector. Con esto se pretendía obtener una primera aproximación de la región cromosómica a la que debía corresponder el inserto. Las secuencias obtenidas se cotejaron en las bases de datos del ENSEMBL. Como era de esperar, la secuencia generada mostraba homología con el cromosoma 3 humano, 9 murino y 22 bovino. No obstante, es de destacar que, aunque las mayores homologías se presentaban en estos tres cromosomas, aparecieron similitudes en varios cromosomas de estas tres especies, incluso en

varias localizaciones dentro de un mismo cromosoma. La posible interpretación de estos resultados se discute más adelante (apartado V.1.).

IV.1.4.2.3. FISH

El BAC 177E6 fue utilizado como sonda para hibridar sobre una extensión de cromosomas ovinos en metafase, siguiendo la metodología explicada en el apartado III.4.2.3. La señal fluorescente apareció sobre el cromosoma 19 (Fig. 12)

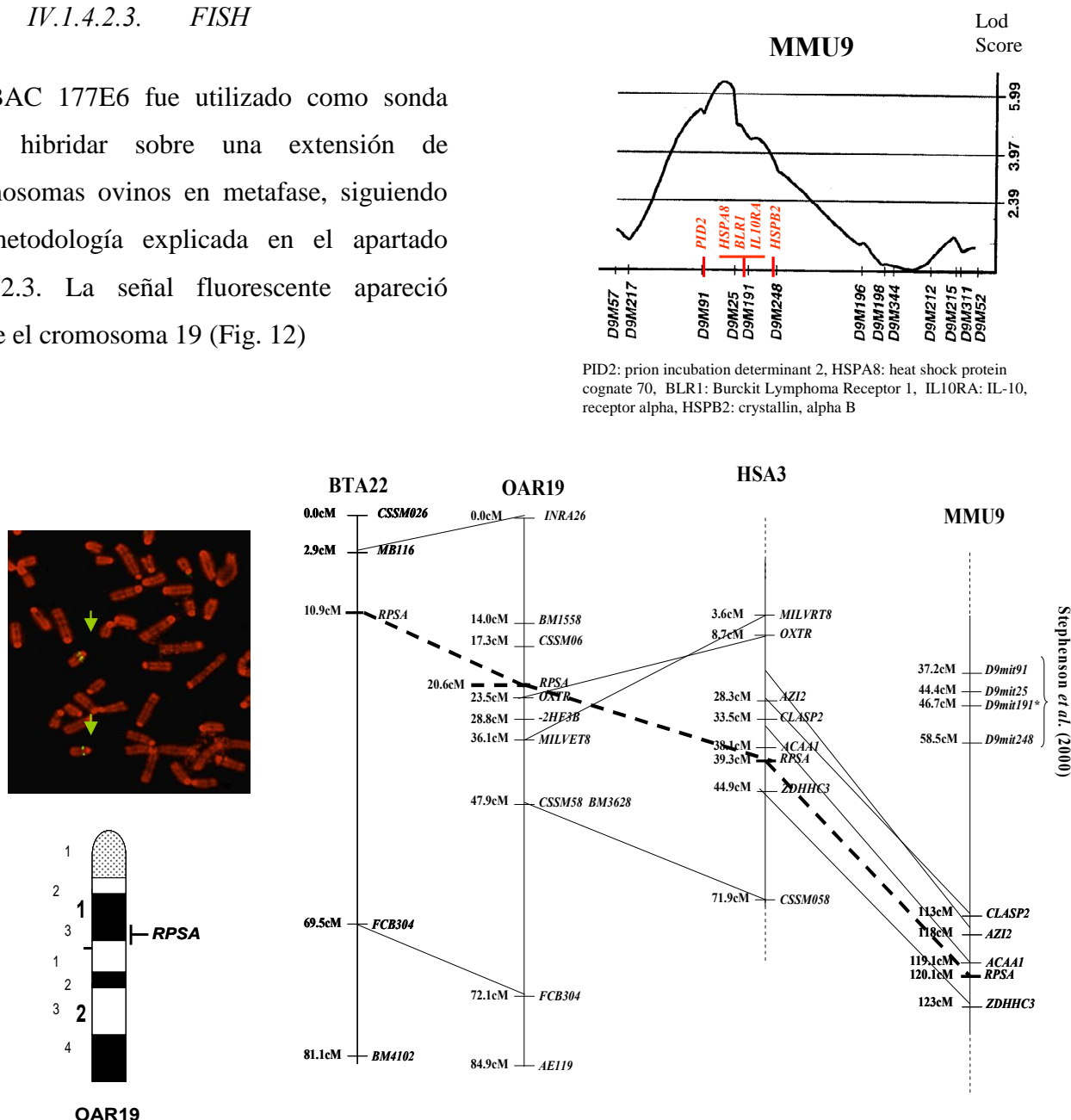


Fig. 12. Cartografiado del gen ovino *RPSA*. En la parte izquierda se muestran los resultados del FISH, y un esquema del cromosoma 19 ovino (OAR19) donde puede verse con más detalle la localización del gen en OAR19q13. Los resultados del cartografiado genético y la homología con otras especies, en la parte derecha, señalan la posición del gen entre los marcadores CSSM06 y -2HF3B. También se representa el intervalo relacionado con el periodo de incubación a SC en un modelo murino descrito por Stephenson (2000).

IV.1.5. Caracterización del gen *RPSA* ovino

Con el fin de aislar y secuenciar el gen *RPSA* ovino se diseñaron más de 40 cebadores. En el apéndice 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted, se muestran sólo aquellas parejas que produjeron resultados, las condiciones utilizadas y el tamaño de los fragmentos generados.

A partir de las secuencias obtenidas de muestras de ADN genómico, de ARNc, de fragmentos obtenidos mediante PCR sobre el DNA del BAC 177E6, o por secuenciación directa de éste, pudieron secuenciarse casi 5000 pb del gen y 683 pb del ARNm, que han sido depositadas en el GenBank y cuyos números de acceso son EF394773 y EF222474, respectivamente (anexo VII.1).

A excepción del intrón 3, que en bovino está constituido por 9Kb, la estructura del gen, incluyendo parte de las regiones 5' y 3' flanqueantes, se determinó por comparación de la secuencias aquí obtenidas con secuencias de humano (U43901) y bovino (BC102490) previamente descritas (Fig 13).

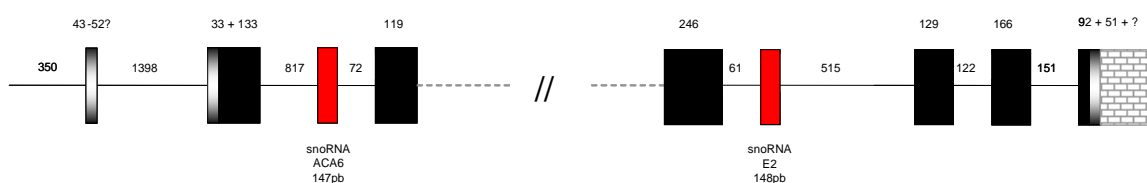


Fig. 13. Representación del gen ovino *RPSA*. Los cuadrados grises y negros representan los exones no codificantes y codificantes, respectivamente. En rojo están representados los snoRNAs, ACA6 y E2. Los números indican el tamaño de cada una de las regiones (pb). Las zonas discontinuas del intrón 3 y el exón 7 señalan zonas que no han podido determinarse en este trabajo.

Así se determinó que el gen *RPSA* ovino se organiza en 7 exones y 6 intrones. También se pudo confirmar la presencia de dos RNAs pequeños ribosomales (snoRNA), necesarios para el procesamiento de los RNAs ribosómicos (Kiss *et al.* 2004; Nag *et al.* 1993; Selvamurugan y Eliceiri 1995), en los intrones 2 y 4. El tamaño y la secuencia de cada uno de ellos se resume en la Fig. 13 y en EF394773 (anexo VII.1). La estructura detallada del gen se explican en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted.

Tras comparar distintas secuencias procedentes de la amplificación de las muestras descritas en los apartados III.2.1.1, III.2.1.3 y III.2.1.4, se encontraron un total de 24 polimorfismos de sustitución y 1 polimorfismo Indel (ver secuencia EF394773 del anexo VII.1).

IV.1.6. Caracterización de la proteína LRP/LR

Con el objetivo de comparar la secuencia aminoacídica del receptor entre varias especies de mamíferos con distinta susceptibilidad a la infección por SC (Castilla *et al.* 2004; Knorr *et al.* 2007; Lysek *et al.* 2005) se consultó la base de datos del GenBank. En ella estaban depositadas las secuencias de muchos mamíferos, sin embargo no la del conejo, que es una de las especies que muestra mayor resistencia a la infección por priones. Es por eso que se decidió secuenciar el ARNm de esta especie para poder, a partir de su secuencia, deducir la composición de aminoácidos de la proteína.

La secuencia parcial del ARNm de conejo ha sido depositada en el GenBank y su número de acceso es EF222473 (anexo VII.1). En la Fig. 5 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted aparece la comparación de las secuencias de LRP/LR de las especies humana, porcina, cunícula, bovina, ovina, canina, felina y de varias especies de roedores. Las conclusiones derivadas de esta comparación se recogen en el apartado V.1.

IV.1.7. Análisis de asociación

Parece lógico pensar que variaciones aminoacídicas en LRP/LR, que afecten a los dominios de unión a PrP (Fig. 14), pudieran afectar a la interacción LRP/LR-PrP^c/PrP^{Sc} constituyendo así parte de la varianza poligénica, no debida a la secuencia del gen *PRNP*, asociada al periodo de incubación del SC que se describió en el apartado I.5.3.

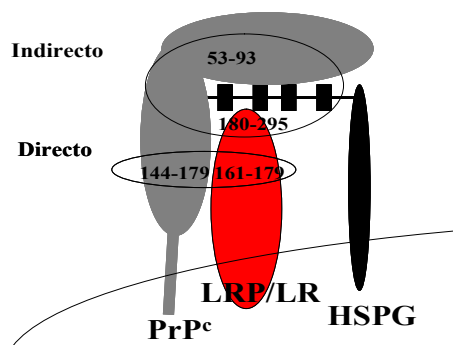


Fig. 14. Esquema de la interacción LRP-LR y PrP. La molécula de PrP se une a LRP-LR a través de dos dominios de unión, uno directo (aa 144–179 de PrP y aa 161–179 de LRP–LR) y otro indirecto mediado por moléculas de HSPG (aa 53–93 de PrP y aa 161–179 de LRP–LR) (Hundt *et al.* 2001).

Con el propósito de estudiar esta región, y teniendo en cuenta que la secuencia que codifica los dos dominios de unión (aa 161–285) se expande desde los últimos 18 nucleótidos del exón 4

hasta la posición 62 del exón 7, se diseñaron dos parejas de cebadores que hibridaban en el exón 4 e intrón 4, y en el intrón 4 y exón 7. La muestra de animales analizada fue la descrita en el apartado III.2.1.1.4. y el procedimiento estadístico empleado el descrito en el apartado III.7.2.

De este modo, se pudieron analizar 8 polimorfismos en las posiciones 198 del exón 4, 27 y 29 del intrón 4, 10 del intrón 5, 69 y 165 del exón 6, 9 del intrón 6 y 96 del exón 7. Ninguna de las variaciones halladas en región codificante provocaba cambio de aminoácido.

IV.1.7.1. Región comprendida entre el exón 4 y intrón 4

El análisis de las secuencias obtenidas con los cebadores que hibridaban en el exón 4-intrón 4 resultó complicado ya que, dependiendo de las parejas empleadas, los resultados del genotipado variaban. En el apéndice 3 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted se muestra la región problemática y la posible interpretación de esos resultados. Así, Cuando se empleaba R1 como cebador reverso, e independientemente del cebador directo, casi un 60% de los animales analizados parecían ser heterocigotos para el polimorfismo Indel de una G en la posición 29 del intrón 4. No apareció ningún animal homocigoto para la delección. Al repetir la secuenciación en esos mismos animales, utilizando para la reacción de amplificación el cebador R2, todos los animales presentaban la G en esa posición (homocigotos para la inserción). Teniendo en cuenta el gran número de pseudogenes derivados de proteínas ribosomales, muchos de los cuales poseen intrones, la existencia de un pseudogén, con una delección en la posición 29 del intrón 4 y cuya secuencia puede amplificarse con R1, pero no con R2, parece verosímil. Además, en las posiciones 198 y 27 de exón 4 y el intrón 4, el pseudogén debe de presentar los nucleótidos G y C. Así, al analizar los cromatogramas, los heterocigotos para estas dos posiciones, en los animales no portadores, aparecían como dos curvas perfectamente montadas, lo cual no era tan evidente en el caso de los animales portadores. Por otra parte, al hacer un BLAT en el que se contrastó la secuencia del snoRNA E2, presente en el intrón 4 del gen, contra todo el genoma bovino, aparecieron resultados en los cromosomas BTA22, BTA5, BTA4, BTA11, BTA3 y BTA2 con unas identidades que variaban entre el 94,6% y el 80%, indicativo de la presencia de parálogos de este snoRNA en otras localizaciones cromosómicas.

Dados los inconvenientes que presentaba el análisis de esta región a la hora de discriminar entre algunos de los genotipos en aquellos animales que presentaban el pseudogén (ver apéndice 3 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted), sólo se analizó la posible asociación entre la presencia/ausencia de éste y la distinta respuesta a SC. En Marcos-Carcavilla *et al.* accepted (Tabla 1) se muestra la distribución de este polimorfismo en las 84 ovejas analizadas. El análisis

indicó que el pseudogén estaba significativamente sobrerrepresentado ($p < 0.05$) en el grupo de animales que permanecían sanos tras haber estado en contacto con la enfermedad.

IV.1.7.2. Región comprendida entre el intrón 4 y exón 7

Las frecuencias genotípicas correspondientes a los cinco SNPs hallados en esta zona se detallan en la Tabla 6. No se encontró asociación ($p > 0.05$) entre ningún genotipo y la resistencia/susceptibilidad a SC para ninguno de los polimorfismos analizados en esta región. Debido al agotamiento de las muestras, estos cinco polimorfismos sólo pudieron analizarse en 56 animales.

Tabla 6: Frecuencias genotípicas de los 5 SNPs analizados en las posiciones 10 del intrón 5, 69 y 165 del exón 6, 9 del intrón 6 y 96 del exón 7 en el gen ovino RPSA en ovejas de raza Rasa Aragonesa pertenecientes todas ellas a rebanos en los que había aparecido SC (apartados III.2.1.1.4.)

Posición	Genotipo	Número de animales	Número de animales sanos		Número de animales enfermos	
			Número	Frec. genotípicas	Número	Frec. genotípicas
I5 ₁₀	AA	0	0	0,00	0	0,00
	AG	1	0	0,00	1	0,04
	GG	55	32	1,00	23	0,96
E6 ₆₉	CC	20	9	0,28	11	0,46
	CT	29	4	0,59	10	0,42
	TT	7	1	0,12	3	0,12
E6 ₁₆₅	CC	0	0	0,00	0	0,00
	CT	3	1	0,03	2	0,08
	TT	53	31	0,97	22	0,92
I6 ₉	CC	42	23	0,72	19	0,79
	CG	13	8	0,25	5	0,21
	GG	1	1	0,03	0	0,00
E7 ₉₆	AA	0	0	0,00	0	0,00
	AG	2	2	0,06	0	0,00
	GG	54	30	0,94	24	1,00

IV.1.8. Análisis de expresión

IV.1.8.1. PCR cuantitativa

El análisis de expresión por PCR cuantitativa se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado III.6. y en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted. Las diferencias encontradas en la cantidad de ARNm del gen *RPSA*, entre animales enfermos de SC y animales control fueron cercanas al 40% en los dos tejidos analizados. Sin embargo, el sentido de esta variación resultó distinto en función del origen de la muestra. Así, mientras que en cerebelo se detectó una disminución cercana al 40% en el grupo de animales enfermos con respecto al grupo control, la relación en bazo fue la contraria, aumentando en el primer grupo en una proporción similar. Sin embargo,

los resultados sólo fueron significativos en cerebelo ($p < 0.006$). El mayor tamaño de las barras indica mayores diferencias dentro de grupo en bazo.

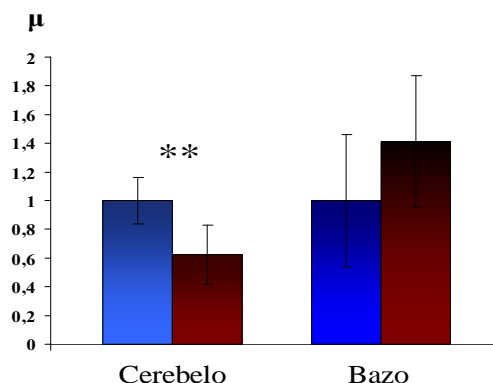


Fig. 15 Expresión relativa (unidades arbitrarias) del gen *RPSA* en cerebelo y bazo de ovejas control (azul) e infectadas de SC (rojo). El eje Y representa la media (μ). Las barras indican las desviaciones estándar. El grado de significación del análisis viene indicado como ** ($p < 0.01$).

IV.1.8.2. Western Blot

Puesto que en muchas ocasiones no hay una relación directa entre los niveles de RNAm y la cantidad de proteína que se produce, se intentó comprobar si se observaba alguna variación a nivel de proteína, utilizando un modelo murino. Para ello se analizó la cantidad de LRP/LR en homogeneizados de cerebro de ratones control e infectados, con la cepa de SC 22L, en fase terminal, de las líneas 129/ola y Tga20 (III.2.1.2.).

Según se puede observar en la Fig. 16, parece que, en los dos modelos murinos, el SC causa una disminución de la concentración de la isoforma precursora (LRP), mientras que los niveles de la forma madura del receptor (LR) no cambian como consecuencia de la enfermedad. Como control endógeno, normalizador de los resultados se utilizó la β -actina.

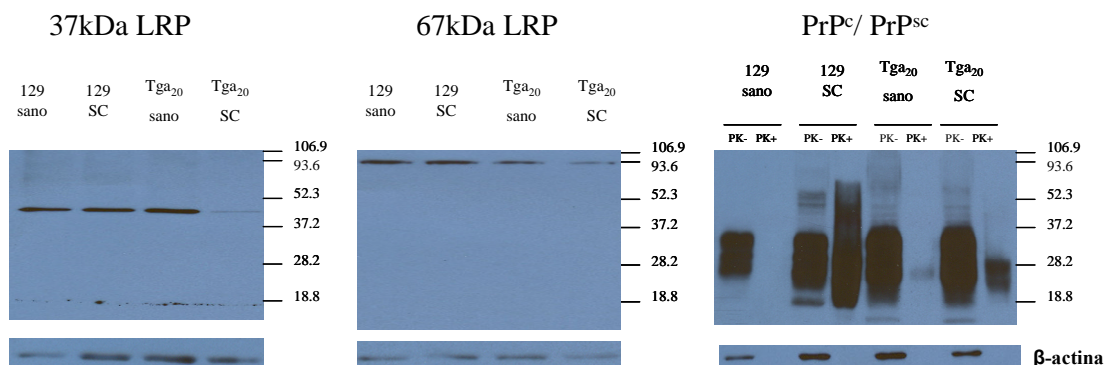


Fig. 16 Cambios en LRP/LR como consecuencia de la infección por SC (izquierda y centro). En el gel de la derecha se muestran la presencia de PrP^c (PK⁻) y PrP^{sc} (PK⁺).

IV.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LRP/LR

Se ha propuesto que LRP/LR y PrP^c podrían desempeñar, de manera conjunta, funciones relacionadas con la adhesión y la supervivencia celular (Baloui *et al.* 2004). A continuación se muestran los resultados obtenidos en varios experimentos que se llevaron a cabo a fin de corroborar esta hipótesis.

IV.2.1. Correlación PrP^c-LRP/LR

La cantidad de LRP/LR y PrP^c fue analizada por *western blot*, en varios modelos de cultivos celulares que expresaban distintos niveles de PrP^c, para intentar verificar una posible correlación en la producción de estas proteínas.

IV.2.1.1. Modelos celulares que expresan distintas cantidades de PrP^c

IV.2.1.1.1. En células

El objetivo fue comprobar si había algún tipo de diferencia en la expresión de LRP/LR en modelos de NF y NSC, en división, de las líneas KO, 129/ola y Tga20, recogidas 48h después de ser despegadas y pasadas a una nueva placa.

Como muestra la Fig. 17, la cantidad de LRP/LR no varía, ni entre NF y NSC, ni con la cantidad de PrP.

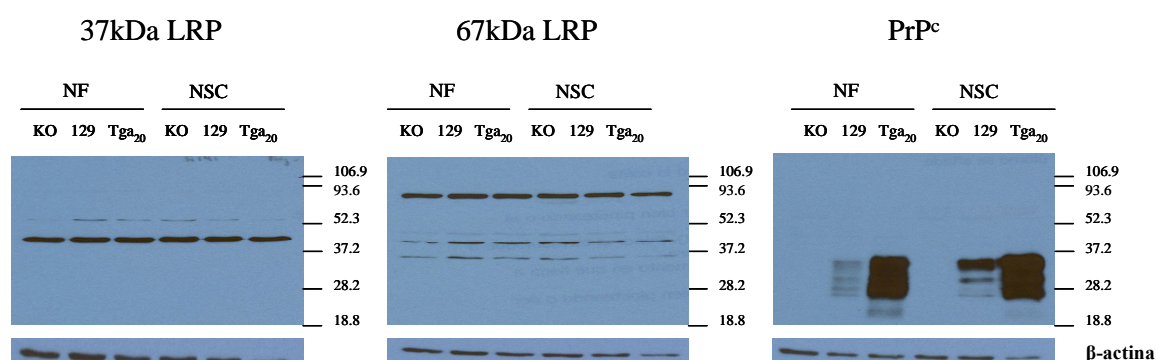


Fig. 17 Variación de LRP/LR y PrP^c en modelos de NF y NSC.

IV.2.1.1.2. En el medio de cultivo

Se ha demostrado que las células cancerosas son capaces de secretar LR (Karpatova *et al.* 1996). Para comprobar que este hecho no es exclusivo de células tumorales, se analizaron los sobrenadantes de varias líneas de NF. Éstos fueron recogidos varios días después haberles cambiado el medio, de manera que la cantidad de proteína fuese detectable.

Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 18. En el sobrenadante de los tres tipos celulares se detectó la isoforma madura (LR). La cantidad fue similar en los tres casos. Por el contrario, la isoforma precursora, LRP, no pudo identificarse en ninguno de los casos. Quizás esta isoforma no se secrete, o si lo hace, lo haga en unas cantidades tan pequeñas que no permitieron su detección.

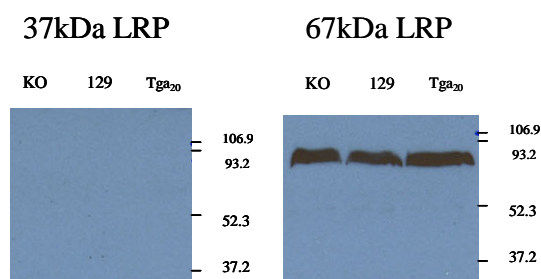


Fig. 18 Presencia de LRP/LR en sobrenadantes celulares de NF

IV.2.1.2. Modelos celulares que expresan PrP^c de manera condicional

Para descartar que la ausencia de variación en los niveles de LRP/LR entre los modelos 129, KO y Tga20 se pudiera deber a una aclimatación de las células a la ausencia o a la sobreexpresión de PrP^c, se realizó un nuevo análisis sobre un modelo celular de NSC que expresaba la PrP^c por inducción con DOX. Así se confirmó, de nuevo, que la expresión de LRP/LR era independiente de la de PrP^c (Fig. 19).

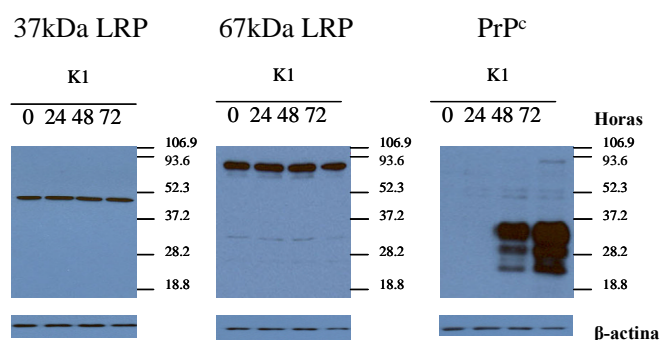


Fig. 19 Variación de la cantidad de LRP/LR en NSC con expresión condicional de PrP^c a varios tiempos inducción con DOX.

IV.2.2. Efecto de la diferenciación sobre LRP/LR

Balaui y cols. (2004) describieron, en modelos de rata, que con la maduración del cerebro los niveles de LR aumentaban y los de LRP disminuían. Por otro lado, Torres y cols. (comunicación personal) observaron un incremento de PrP^c según avanza la diferenciación celular. Por ello, para determinar una posible acción conjunta de LRP/LR y PrP^c en este proceso, se analizaron varios modelos celulares a distintos tiempos de diferenciación (0, 3 y 7 días).

Los resultados de este apartado se recogen en la Fig. 20. Teniendo la β -actina como control endógeno parece que, en los cuatro modelos celulares analizados, tanto LRP como LR disminuyen con la diferenciación. Por el contrario, la cantidad de PrP^c aumenta con el paso de los días, salvo en el modelo KO, que no expresa esta proteína.

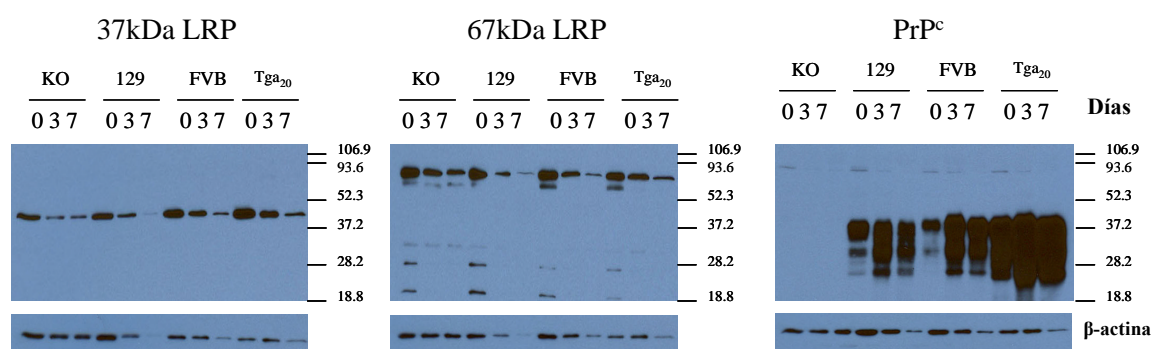


Fig. 20 Variación de la cantidad de LRP/LR y PrP^c con la diferenciación en modelos de NSC de las líneas KO, 129, FVB y Tga₂₀.

IV.3. ANÁLISIS DEL GEN *HSP90A1*

La chaperona conocida como Hsp90 (del inglés, *90kDa heat shock protein*) es una de las proteínas más abundantes de la célula. Participa en múltiples funciones celulares, entre las que destacan: transducción de señales, ensamblaje y degradación de proteínas, supervivencia y muerte celular. En relación con el SC y el papel que esta chaperona pudiera desempeñar, hay que tener en cuenta algunos de los procesos en los que ésta participa: 1) Es un represor de Factor 1 de Shock Térmico (HSF1), que, a su vez, es un activador de otros genes de stress (Zou *et al.* 1998). 2) Es responsable del mantenimiento de la integridad funcional del proteosoma (Imai *et al.* 2003). De manera que puede hipotetizarse que, durante el proceso neurodegenerativo, las proteínas en estados no nativos (PrP^{sc}) competirán con HSF1 y el proteosoma para unirse a

Hsp90. Como resultado, HSF1 se liberará del complejo, activando la expresión de genes en el núcleo, y la integridad del proteosoma se verá comprometida. En consecuencia, la PrP^c, que en condiciones normales es degradada por el proteosoma, podrá acumularse en el citoplasma, aumentando la cantidad de sustrato susceptible de transformarse a PrP^{sc}.

Además, se ha demostrado que Hsp90 impide la producción de oligómeros tóxicos (Evans *et al.* 2006) y que tiene efectos neuroprotectores (Kakimura *et al.* 2002) en otra amiloidosis muy conocida: la enfermedad de Alzheimer .

La Hsp90 está constituida por dos isoformas citoplásmicas, originadas a través de duplicaciones génicas a lo largo de la evolución, que comparten una homología del 85% a nivel de su secuencia proteica: Hsp90 α (forma inducible) y Hsp90 β (forma constitutiva). En este trabajo se ha estudiado el gen que codifica la forma inducible (*HSP90AA1*). El hecho definitivo por el que se eligió este gen es que está en el cromosoma 12 murino, en una región que, por cartografía comparativa, se corresponde con el cromosoma 18 ovino, y que ambas han sido descritas como regiones QTL candidatas a contener genes responsables del periodo de incubación a SC (Lloyd *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2003a).

IV.3.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen *HSP90AA1* en la especie ovina

El primer paso fue buscar las zonas más divergentes entre los genes que codifican la Hsp90 α (*HSP90AA1*) y la Hsp90 β (*HSP90AB*) para poder diseñar parejas de cebadores evitando amplificaciones inespecíficas. Para ello se compararon secuencias de ARNm, depositadas en la base de datos del GenBank, de cada una de estas isoformas en las especies humana (BC023006 y BC0668474) y bovina (NM_001012670 y AB072369).

De este modo, se diseñaron cinco parejas de cebadores. Sin embargo, solo pudieron aislarse y secuenciarse dos fragmentos que, tras ser contrastados con las bases de datos, se confirmó correspondían a las regiones del exón 3 e intrón10-exón11. En base a esta última secuencia se generaron nuevas parejas de cebadores con las que se realizó el cribado de librería de BACs ovinos del INRA (III.4.2.1) y la búsqueda de polimorfismos y de dianas de restricción (III.3.7 y III.3.8) que sirvieron para llevar a cabo el cartografiado genético (III.4.1). Estas regiones están incluidas en la secuencia DQ983231 que fue depositada en la base de datos del GenBank.

IV.3.2. Cartografiado del gen

IV.3.2.1. Cartografiado genético

El polimorfismo de sustitución A/G, encontrado en la posición 84 del intrón 10, fue analizado en las familias de referencia del AgResearch (apartado III.2.2 y III.4.1.). Para ello, se llevó a cabo una reacción de PCR con cebadores que hibridaban con los exones 10 y 11. El producto de amplificación lo constituían 730 pb que al ser digeridas con el enzima de restricción Tsp509I (New England BioLabs) generaban, en función del nucleótido situado en la posición 84, el siguiente patrón de bandas: el alelo A daba lugar a 4 fragmentos (496, 101, 89 y 50 pb), mientras que el alelo G daba lugar a 3 bandas (496, 190 y 50 pb). Los cebadores y las condiciones requeridas se detallan en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b.

El análisis de ligamiento, mediante el programa estadístico CRIMAP 2.4 bajo la opción multipoint, posicionó el gen en la región distal del cromosoma 18 ovino, a 2,7 cM del marcador VNTR16 (figura 3), con un valor del logaritmo en base 10 de la verosimilitud de -293,72.

IV.3.2.2. Cartografiado citogenético

IV.3.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen HSP90AA1 ovino

Se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre las 39 SMs con una pareja de cebadores que hibridaba con el intrón 10-exón 11 (ver apéndice 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b) y se obtuvo un único resultado positivo: SM7 (Fig. 21). A continuación, se realizó una nueva PCR para obtener la dirección exacta del clon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.4.2.1.

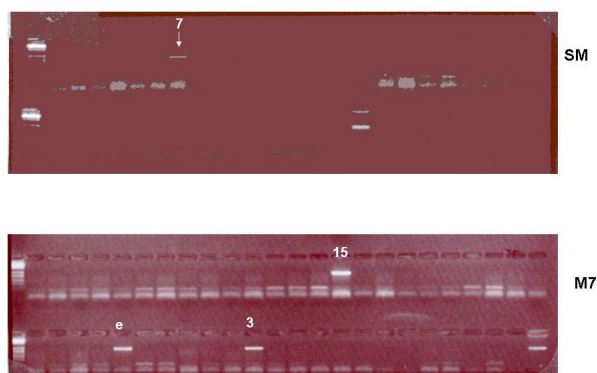


Fig. 21 En la parte superior se muestra la PCR con la que se identificaron las SM positivas. A continuación, se muestran los resultados de la amplificación correspondiente a la M7. Según esto, la posición exacta del gen dentro de la genoteca es la siguiente: $[(7-1) \times 24 + 15 / E / 3] = 159E3$.

Para la realización del FISH y el aislamiento de la secuencia del gen, el DNA del BAC 159E3 se extrajo según se indica en los apartados III.3.1.3. y III.4.2.2.

IV.3.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC

En una primera etapa, se secuenciaron los extremos del inserto usando primers específicos del vector. Con esto se pretendía obtener una primera aproximación de la región cromosómica a la que debía corresponder el inserto. Las secuencias obtenidas se cotejaron en las bases de datos del ENSEMBL. Como era de esperar, la secuencia generada mostraba homología con el cromosoma 14 humano, 12 murino y 21 bovino.

IV.3.2.2.3. Resultados del FISH

El BAC 159E3 fue utilizado como sonda para hibridar sobre una extensión de cromosomas ovinos en metafase, siguiendo la metodología explicada en el apartado III.4.2.3. La señal apareció sobre el cromosoma 18 (Fig. 22).

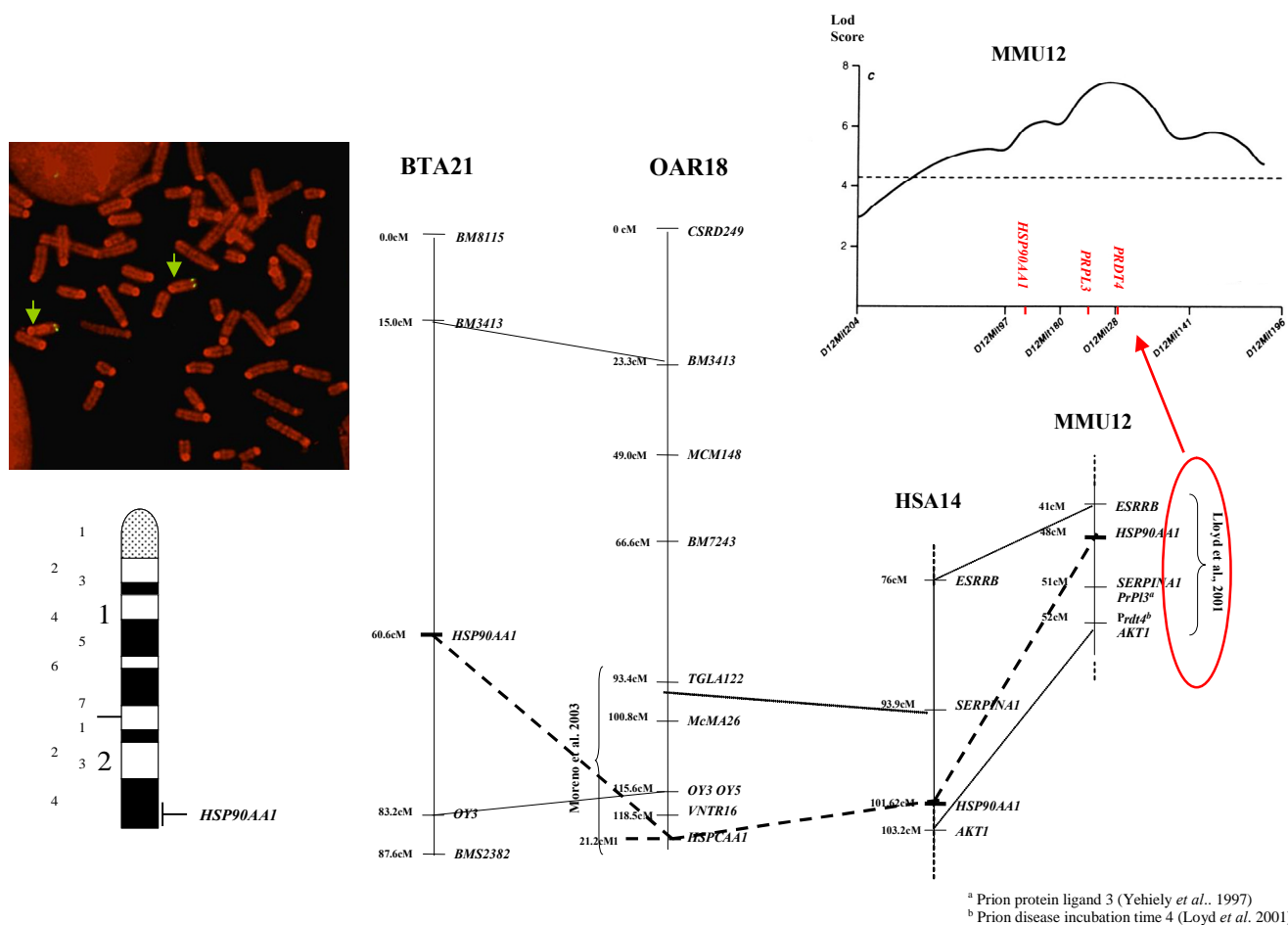


Fig. 22. Cartografiado del gen ovino *HSP90AA1*. En la parte izquierda se muestran los resultados del FISH y un esquema del cromosoma 18 ovino (OAR18) donde puede verse con más detalle la localización del gen en OAR18q24dist. Los resultados del cartografiado genético y la homología con otras especies, en la parte derecha, señalan la posición del gen a continuación del marcador VNTR19 en ovino. También se representa el intervalo relacionado con el periodo de incubación a SC en un modelo murino descrito por Loyd y cols. (2001).

IV.3.3. Caracterización del gen *HSP90AA1* ovino

Con el fin de aislar y secuenciar el gen *HSP90AA1* ovino se diseñaron 12 cebadores heterólogos basados en secuencias humanas (NT 026437), murinas (NT039551) y bovinas (NW_930044.1, NW 270059 y NM001012670.1) y 13 cebadores específicos a partir de las secuencias ovinas que se fueron aislando. En el apéndice 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b se detallan las condiciones utilizadas y el tamaño de los fragmentos generados, sólo de aquellas parejas de cebadores que produjeron resultados.

A partir de las secuencias obtenidas de muestras de ADN genómico, ADNc y fragmentos obtenidos mediante PCR sobre el DNA del BAC 159E3 o por secuenciación directa de éste, pudieron secuenciarse 5917 pb del gen y 2304 pb del ARNm, que fueron depositados en el GenBank con números de acceso DQ983231 y EF091713, respectivamente (anexo VII.1.).

La estructura del gen, incluyendo parte de las regiones 5' y 3' flanqueantes, se determinó por comparación de las secuencias aisladas en este trabajo (DQ983231 y EF091713) con las secuencias bovinas AB072368.1 y ENSBTAG00000006270. Así se determinó que el gen *HSP90AA1* ovino está constituido por 6Kb, organizadas en 11 exones y 10 intrones, que codifican una proteína de 733 aas. La estructura del gen se explica detalladamente en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b.

Tras comparar distintas secuencias procedentes de la amplificación de las muestras ovinas descritas en los apartados III.2.1.1, III.2.1.3 y III.2.1.4, se encontraron un total de 34 polimorfismos de sustitución: doce en región codificante, todos ellos silentes (exones 4, 7, 8, 9, 10, y 11), catorce en la región 5'flanqueante y ocho en el intrón 10 (descritos en DQ983231, anexo VII.1.). La posible implicación de estos últimos en relación a la resistencia/susceptibilidad a SC se discute en los apartados IV.2.6 y V.2.

IV.3.4. Análisis de asociación

Teniendo en cuenta las consecuencias que la acumulación de PrP^{sc} puede tener sobre la actividad de la Hsp90 α (apartado IV.2.2), parece lógico pensar que mutaciones que afecten a los niveles de expresión de esta chaperona pudieran estar relacionadas con la distinta respuesta a la enfermedad en animales con igual genotipo de *PRNP*. Por ello, la búsqueda de polimorfismos se hizo en las

regiones que, normalmente, tienen mayor importancia en la regulación de la expresión de genes: regiones 5' y 3' flanqueantes.

IV.3.4.1. Región 5' flanqueante

Se diseñó una pareja de cebadores en -700 y + 400 pb del punto de inicio de la transcripción. Así pudieron analizarse 14 polimorfismos de sustitución y 2 tipo Indel. Como puede observarse en la Fig. 1A y 1B en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b, algunos de estos polimorfismos afectaban a posibles elementos reguladores (Lyf-1, ZBP-89, Cdx, SP-1...).

Tras descartar aquellos SNPs que presentaban frecuencias alélicas extremas, se analizaron los SNPs localizados en las posiciones -660, -528, -524 y -468.

Los SNPs en las posiciones -524 y -468 se encuentran ligados mostrando los genotipos GG GG, GT GT y TT TT. En Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b (Tabla 1) se detallan las frecuencias genotípicas para los polimorfismos en las posiciones -660, -528, -524 (las frecuencias del SNP en -468 son las mismas que las del SNP en -524), en animales de raza Rasa Aragonesa, Manchega y Assaff. La proporción de los genotipos es similar entre las distintas razas.

Los análisis de máxima verosimilitud detectaron asociación ($p < 0.05$) entre el genotipo para estas 4 posiciones y la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Tabla 2 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b). De manera que el genotipo CC AA GT GT parece conferir mayor resistencia frente a la infección por SC. Por el contrario, los genotipos CG AG TT TT, GG GG TT TT y CG AG GT GT estarían asociados a una mayor susceptibilidad.

Analizando por separado cada uno de estos SNPs, se encontró una fuerte asociación ($p < 0.001$) entre la resistencia/susceptibilidad a la enfermedad y la transición C/G en la posición -660, que afecta a un posible sitio de unión a Lyf-1 y/o a ZBP-89. Este hecho era independiente de los genotipos presentes en las otras tres posiciones. Así, mientras que el genotipo CC apareció sobrerrepresentado en las ovejas que permanecían sanas, el heterocigoto CG fue más común entre los animales enfermos. El homocigoto GG solo lo presentaban tres animales, 2 enfermos y uno sano.

IV.3.4.2. Región intrón 10-exón11

Se diseñó una pareja de cebadores en los exones 10 y 11. Así pudieron detectarse 13 SNPs en la región comprendida entre el intrón 10 y el exón 11. Tras descartar aquellos polimorfismos que presentaban frecuencias alélicas extremas, se estudiaron seis SNPs, que estaban totalmente

ligados, situados en las posiciones 40, 165, 178, 205, 220 y 239 del intrón 10 (véase Fig. 1C y 1D en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b)

Al igual que en la región 5' flanqueante, las frecuencias genotípicas de las distintas razas estudiadas resultaron ser similares (Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b). Los genotipos observados fueron GG CC GG CC TT TT y AG CT CG CT CT CT. En este estudio no se encontró ningún animal AA TT AA TT CC CC.

Los análisis de máxima verosimilitud revelaron asociación ($p < 0.01$) entre el genotipo para estas 6 posiciones y la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Tabla 3 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b). Todos los animales heterocigotos presentaban la enfermedad.

IV.3.5. Análisis de expresión

La expresión de *HSP90AA1* se estudió por PCR cuantitativa (Fig. 23). La metodología desarrollada se explica en el apartado III.6 y en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b. No se encontraron diferencias significativas entre animales enfermos y controles en ninguno de los tejidos estudiados ($p > 0.05$).

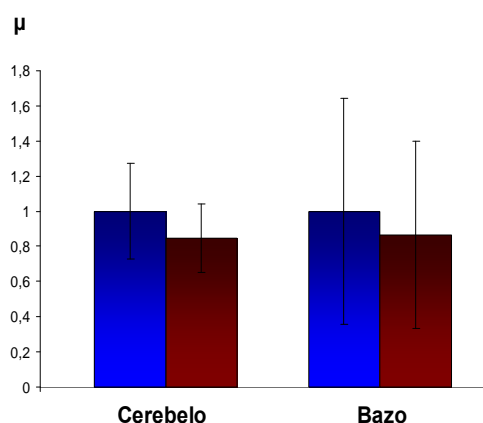


Fig. 23 Expresión relativa (unidades arbitrarias) del gen *HSP90AA1* en cerebelo y bazo de ovejas control (azul) e infectadas de SC (rojo). El eje Y representa la media (μ). Las barras indican las desviaciones estándar.

IV.4. ANÁLISIS DEL GEN *IL1B*

La Interleuquina-1 (IL-1) es la familia de citoquinas proinflamatorias más ampliamente estudiada. El nombre de interleuquina se debe a que estas citoquinas son moléculas de comunicación intercelular producidas por células del sistema hematopoyético (leucocitos). Los miembros mejor caracterizados de esta familia son la IL-1 α y la IL-1 β (Rothwell y Luheshi 2000). Ambas citoquinas inician la traducción de señales a través del receptor de IL-1 tipo I (IL-1r1), y su acción es reprimida por un antagonista, IL-1Ra, cuyo estudio se aborda en el apartado IV.5.

El daño cerebral y la inflamación desencadenan la producción de IL-1 α e IL-1 β en respuesta a la activación de la microglía. Ambas citoquinas actúan sobre IL-1r1, provocando la activación de otra serie de procesos y cascadas entre las que cabe destacar la activación de procesos neuroendocrinos, expresión de genes, producción de óxido nítrico y de otras citoquinas...

La sobreexpresión de citoquinas de la familia IL-1 se ha observado en varias enfermedades neurodegenerativas priónicas (Baker y Manuelidis 2003; Brown *et al.* 2003; Xiang *et al.* 2004) y no priónicas como el Alzheimer, el Síndrome de Down, el Parkinson, la esclerosis múltiple, el SIDA y la epilepsia (Merrill *et al.* 1996; Mogi *et al.* 1994; Sheng *et al.* 1996; Vitkovic *et al.* 2000). Además, se ha demostrado la existencia de polimorfismos en los genes que codifican IL-1 β (*IL1B*) relacionados con un mayor riesgo de padecer Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos (Licastro *et al.* 2004; McGeer *et al.* 2002; Sciacca *et al.* 2003). Por otra parte, se han descrito varias regiones en el cromosoma 2 murino asociadas al periodo de incubación de SC y BSE (Lloyd *et al.* 2001; Manolakou *et al.* 2001), situándose el gen *IL1B* en el intervalo de dicho cromosoma precisado por Lloyd y cols. (2001). Además, por cartografía comparativa, esta región está incluida en el cromosoma 3 ovino, donde también ha sido descrita una región QTL asociada al periodo de incubación a SC (Moreno *et al.* 2003a). Todos estos resultados llevaron a la elección del gen ovino *IL1B* como posible candidato funcional y posicional involucrado en la distinta respuesta a SC en el ganado ovino.

IV.4.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen *IL1B* en la especie ovina

A partir de secuencias ovinas (X54796.1), humanas (U26540, NM_0163717 y NM_004487), murinas (XM_287273 y NT_039238) y bovinas (NW620243 y XM_215605) (ver Tabla 1 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a), se diseñaron varios cebadores que permitieron aislar dos fragmentos del gen. Éstos comprendían desde la región 5' flanqueante hasta parte del intrón 3, y

desde la parte final de éste hasta el exón 5. Estas regiones están incluidas en las secuencias DQ128078S1 y DQ128078S2 que fueron depositadas en la base de datos del GenBank.

A partir de estas secuencias pudieron diseñarse nuevas parejas de cebadores que fueron posteriormente utilizadas en el cribado de la genoteca de BACs ovinos del INRA (III.4.2.1) y en el genotipado de los animales de la familia de referencia del AgResearch.

IV.4.2. Cartografiado del gen

IV.4.2.1. Cartografiado genético

El SNP A/G, encontrado en la posición 1196 del intrón 1, fue analizado en las familias de referencia del AgResearch (apartado III.2.2 y III.4.1.). Para ello, se llevó a cabo una PCR con cebadores que hibridaban con los intrones 1 y 2 (ver Tabla 1 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a). El producto de amplificación fue un fragmento de 594 pb que al ser digerido con el enzima de restricción *BsII* (New England BioLabs) produjo, en función del nucleótido situado en la posición 1196, el siguiente patrón de bandas: el alelo G daba lugar a 4 fragmentos (309,147,122 y 16 pb), mientras que el alelo A daba lugar a 3 bandas (431, 147 y 16 pb).

El análisis de ligamiento, mediante el programa estadístico CRIMAP 2.4 bajo la opción multipoint, posicionó el gen en el cromosoma 3 ovino, a 1,6 y 4,2 cM de los marcadores *IL1A* y *LSCV44*, respectivamente, con un valor del logaritmo en base 10 de la verosimilitud de -165,304 (Fig. 27).

IV.4.2.2. Cartografiado citogenético

*IV.4.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen *IL1B* ovino*

Se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre las 39 SMs con una pareja de cebadores que hibridaba con los intrones 2 y 3 (Tabla 1 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a) y se obtuvieron dos resultados positivos: SM8 y SM18 (Fig. 24). A continuación, se realizó una nueva PCR para obtener la dirección exacta del clon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.4.2.1.

Para la realización del FISH y el aislamiento de la secuencia del gen, el DNA de los BACs 188D8 y 431F2 se extrajo según el procedimiento descrito en los apartados III.3.1.3. y III.4.2.2.

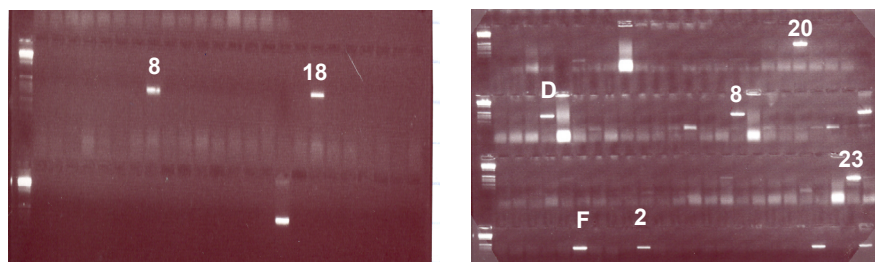


Fig. 24 A la izquierda se muestra la PCR con la que se identificaron las 2 SMs positivas (SM 8 y SM 18). A la derecha las PCRs que identifican la posición exacta del gen dentro de la genoteca. Según esto, la posición del gen dentro de la genoteca es la siguiente: para la SM8 [(8-1)x24+20/D/8] = 188D8 y para la SM18 [(18-1)x24+23/F/2]= 431F2.

IV.4.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC ovino

Con el fin de inferir el entorno cromosómico dentro del que se hallaba el gen *IL1B*, se secuenciaron los extremos del inserto usando cebadores específicos del vector. Las secuencias obtenidas se cotejaron con las bases de datos BLAST y ENSEMBL. Como era de esperar, la secuencia generada con uno de los cebadores mostró homología con el cromosoma 11 bovino. Sin embargo, la secuencia generada con el otro cebador, inesperadamente, presentó homología con una secuencia del cromosoma 5 humano.

IV.4.2.2.3. Resultados del FISH

El BAC 431F2 fue utilizado como sonda para hibridar sobre una extensión de cromosomas ovinos en metafase (apartado 2.2.2.4). La señal apareció sobre dos cromosomas diferentes: OAR3 y OAR5 (Fig. 25). Teniendo en cuenta éste y el resultado obtenido en el apartado anterior, parece que el BAC 431F2 era portador de dos insertos, y por tanto era quimérico.

La localización exacta y única del gen en OAR3p22 se confirmó haciendo una nueva hibridación utilizando como sonda el BAC 188D8 (Fig. 25).

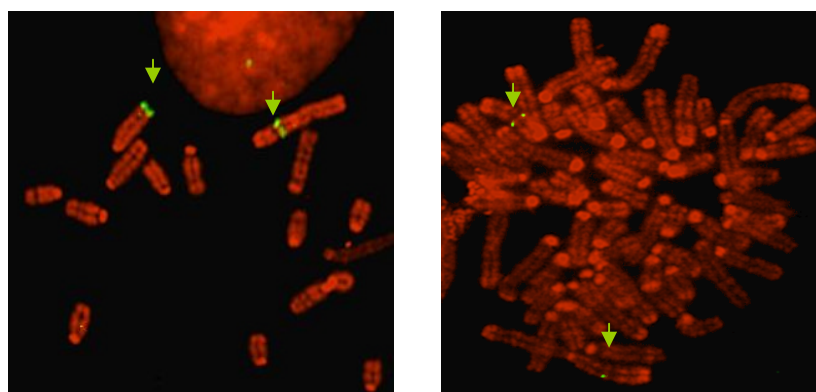


Fig. 25 El BAC quimérico BAC 431F2 (izq.) hibrida sobre OAR5 (izq.) y OAR3 (dcha.). El BAC 188D8 (dcha.) posiciona el gen *IL1B*, únicamente, en OAR3p22. Nótese que el cromosoma 3 de la parte superior se encuentra replegado sobre sí mismo.

IV.4.3. Caracterización parcial del gen *IL1B* ovino

Se diseñaron un total de 16 cebadores: 4 heterólogos y 12 específicos de ovino, a partir de las secuencias citadas en el apartado IV.4.1. y de las secuencias ovinas que se fueron aislando. En la Tabla 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* (2007a) se muestran sólo aquellas parejas que produjeron resultados, las condiciones utilizadas y el tamaño de los fragmentos generados.

Así, a partir de las secuencias obtenidas de muestras de ADN genómico se secuenciaron 327 pb correspondientes a una región reguladora previamente descrita en humano (DQ831948) y otras dos secuencias de 2661pb (DQ128078S1) y de 1854pb (DQ128078S2) que comprenden desde 584 pb por encima del punto de inicio de la transcripción hasta parte del intrón 3, y desde parte del intrón 3 hasta parte del exón 5, respectivamente. La estructura de las regiones aisladas gen ovino se explica detalladamente en Marcos-Carcavilla *et al.* (2007a).

Tras comparar distintas secuencias procedentes de la amplificación de las muestras ovinas descritas en los apartados III.2.1.1, III.2.1.3 y III.2.1.4, se encontraron 29 SNPs y un Indels (ver secuencias DQ128078S1 y DQ128078S2 en el anexo VII.1).

IV.4.4. Análisis de Asociación

Teniendo en cuenta las consecuencias que un exceso de actividad de la IL-1 β pudiera tener a la hora de exacerbar el daño causado por la acumulación de PrP^{sc}, parece lógico pensar que mutaciones que afecten a los niveles de expresión de esta citoquina pudieran estar relacionadas con la distinta respuesta a la enfermedad en animales con igual genotipo de *PRNP*. Por ello, la búsqueda de polimorfismos se llevó a cabo en las regiones reguladoras descritas por Kominato *et al.* (Kominato *et al.* 1995), Hiscott *et al.* (Hiscott *et al.* 1993), Hunninghake *et al.* (Hunninghake *et al.* 1992), Shirakawa *et al.* (Shirakawa *et al.* 1993) y Tsukada *et al.* (Tsukada *et al.* 1994) en la especie humana. En ellas se describen varios elementos de unión a factores de transcripción, localizados a largo de una región reguladora situada a unos 6000pb del punto de inicio de la transcripción (*enhancer*) y del promotor del gen.

Así, se analizaron 324 pb de la región enhancer y las primeras 660 pb de la secuencia DQ128078S1 correspondientes a la región 5'flanquente y exón 1 del gen. Con el fin de comprobar la existencia de elementos reguladores en la especie ovina, se llevó a cabo un estudio comparativo entre las secuencias aisladas, y secuencias bovinas (NW_620243 y AF026543) y

humanas (U26540 y M15840), encontradas en la base de datos del GenBank. Se utilizaron los programas informáticos TFsearch, SignalScan y RGSiteGroupScan para corroborar que los elementos reguladores descritos en estas especies (Kominato *et al.* 1995, Hiscott *et al.* 1993, Hunninghake *et al.* 1992, Shirakawa *et al.* 1993 y Tsukada *et al.* 1994) también estaban presentes en la especie ovina, así como para poder detectar nuevos motivos de unión a factores de transcripción.

En la Fig. 2 en Marcos-Carcavilla *et al.*, 2007a se muestra un resumen de los elementos reguladores así predichos.

Tras descartar aquellos SNPs que presentaban frecuencias alélicas extremas, sólo se encontró asociación ($p < 0.05$) para la transversión C/G en la posición -1257 (se corresponde con la posición 22 representada en la Fig. 2B de Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a) del punto de inicio de la transcripción (posición 1257 de esa misma figura).

Debido al agotamiento de las muestras, este polimorfismo sólo pudieron analizarse 57 animales. Las frecuencias genotípicas para este polimorfismo en animales de las razas Rasa Aragonesa, y la probabilidad de desarrollar la enfermedad en función del genotipo para ese SNP, pueden estimarse a partir de la Tabla 7. Así, el genotipo CG parece conferir mayor resistencia frente a la infección por SC ($p < 0.02$). Este hecho era independiente de los genotipos presentes en otras posiciones. Así, el genotipo CG estaba sobrerrepresentado en las ovejas que permanecían sanas tras haber estado en contacto con la enfermedad (17/23), el homocigoto GG estaba ligeramente más representado en el grupo de animales que sucumbieron a ella (19/33) y el homocigoto CC sólo se encontró en un animal enfermo.

Tabla 7. Genotipos detectados para el SNP en posición -1257 en el gen ovino *IL1B* en ovejas de la raza Rasa Aragonesa pertenecientes todas ellas a rebaños en los que había aparecido SC (apartado III.2.1.1.4.).

	Enfermos	Sanos	Total
CC	0	1	1
CG	17	6	23
GG	14	19	33
	31	26	57

IV.4.5. Análisis de expresión

La expresión de *IL1B* se estudió por PCR cuantitativa. La metodología desarrollada se explica en el apartado III.6. y en Marcos-Carcavilla *et al*, 2007a. Los resultados se muestran junto con los de *IL1RN* en el apartado IV.5.4.1.

IV.5. ANÁLISIS DEL GEN *IL1RN*

La proteína codificada por el gen *IL1RN*, IL-1Ra, pertenece a la familia de citoquinas de la interleuquina 1 (IL-1). Esta proteína inhibe las actividades de IL-1 α e IL-1 β , y modula muchas de las respuestas de tipo inmune e inflamatorias.

El término antagonista de la IL-1, IL-1Ra, incluye dos isoformas: sIL-1Ra (secretada) y icIL-1Ra (citoplásmica). Ambas derivan del mismo gen como consecuencia del diferente procesamiento del exón 1 durante el proceso de maduración del ARNm.

Se ha demostrado la existencia de polimorfismos de *IL1RN* relacionados con un mayor riesgo de padecer varias enfermedades como consecuencia de una incorrecta regulación de la actividad de IL-1 β (Kanemoto *et al.* 2000; Nemetz *et al.* 1999; Pyo *et al.* 2003; Santtila *et al.* 1998; Watanabe *et al.* 2005).

Por otra parte, se han descrito varias regiones en cromosoma 2 murino implicadas en la modulación del periodo de incubación a SC y BSE (Lloyd *et al.* 2001; Manolakou *et al.* 2001). El gen *IL1RN* está próximo al intervalo precisado por Manolakou (2000) en dicho cromosoma. Por cartografía comparativa, esta región está incluida en el cromosoma 3 ovino, que, como se ha comentado anteriormente, contiene regiones asociadas al periodo de incubación a SC (Moreno *et al.* 2003a). Todo ello llevó a la elección del gen *IL1RN* como posible candidato funcional y posicional involucrado en la distinta respuesta a SC en el ganado ovino.

IV.5.1. Aislamiento de los primeros fragmentos del gen *IL1RN* en la especie ovina

Dos parejas de cebadores heterólogos, derivadas de secuencias humanas (AC024704, M97748 Y X77090.1) y bovinas (NW_205428 y NW_174357) (ver Tabla 1 en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a), sirvieron para aislar la región 5' flanqueante y el exón 1 de la forma sIL-1Ra y el intrón

3 y parte del exón 4, comunes a ambas isoformas. Estas regiones están incluidas en las secuencias DQ102853 y DQ660409 que fueron depositadas en la base de datos del GenBank.

A partir de la secuencia del intrón 3 se diseñó una nueva pareja de cebadores que permitió el cribado de la genoteca de BACs ovinos del INRA (III.4.2.1) y el genotipado de los animales de la familia de referencia del AgResearch.

IV.5.2. Cartografiado del gen

IV.5.2.1. Cartografiado genético

El polimorfismo Indels, encontrado en el intrón 3, fue analizado en las familias de referencia del AgResearch (apartado III.2.2 y III.4.1.). Para ello, se llevó a cabo una PCR con cebadores que hibridaban con en el exón 3 (ver Tabla 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a). El producto de amplificación era un fragmento de unos 200 pb que al ser migrado en geles de agarosa al 4% permitía identificar un polimorfismo Indels de 14 bp (GATCTGTGCCACAC).

El análisis de ligamiento, mediante el programa estadístico CRIMAP 2.4 bajo la opción multipoint, posicionó el gen en el cromosoma 3 ovino, a 1,6 y 4,2 cM de los marcadores *IL1A* y *LSCV44*, respectivamente (Fig. 27), con un valor del logaritmo en base 10 de la verosimilitud de -165,304.

IV.5.2.2. Cartografiado citogenético

IV.5.2.2.1. Aislamiento de un BAC que contenía el gen *IL1RN* ovino

Se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre las 39 SMs con una pareja de cebadores que hibridaba con el intrón 3 (ver Tabla 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* 2007a) y se obtuvo un único resultado positivo: SM17. A continuación, se realizó una nueva PCR para obtener la dirección exacta del clon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.4.2.1. (Fig. 26).

Para la realización del FISH y el aislamiento de la secuencia del gen, el DNA del BAC 387D1 se extrajo según el procedimiento descrito en los apartados III.3.1.3. y III.4.2.2.

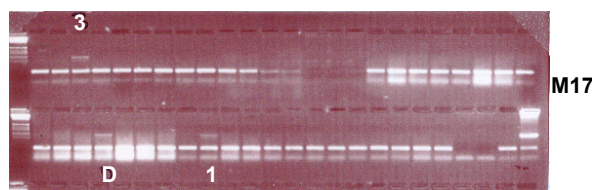


Fig. 26 Resultados de la amplificación correspondiente a la M17. Según esto, la posición exacta del gen dentro de la genoteca es la siguiente: $[(17-1) \times 24 + 3 / D / 1] = 387D1$.

IV.5.2.2.2. Secuenciación de los extremos del BAC

Se secuenciaron los extremos del inserto usando cebadores específicos del vector para obtener una primera aproximación de la región cromosómica a la que debía corresponder el inserto. Las secuencias obtenidas se cotejaron en las bases de datos del ENSEMBL y BLAT. Se obtuvo homología con muchos cromosomas, entre ellos con el cromosoma 2 humano.

IV.5.2.2.3. Resultados del FISH

El BAC159E3 fue utilizado como sonda para hibridar sobre una extensión de cromosomas ovinos en metafase, siguiendo la metodología explicada en el apartado III.4.2.3. La señal apareció sobre el cromosoma 3 (Fig27).

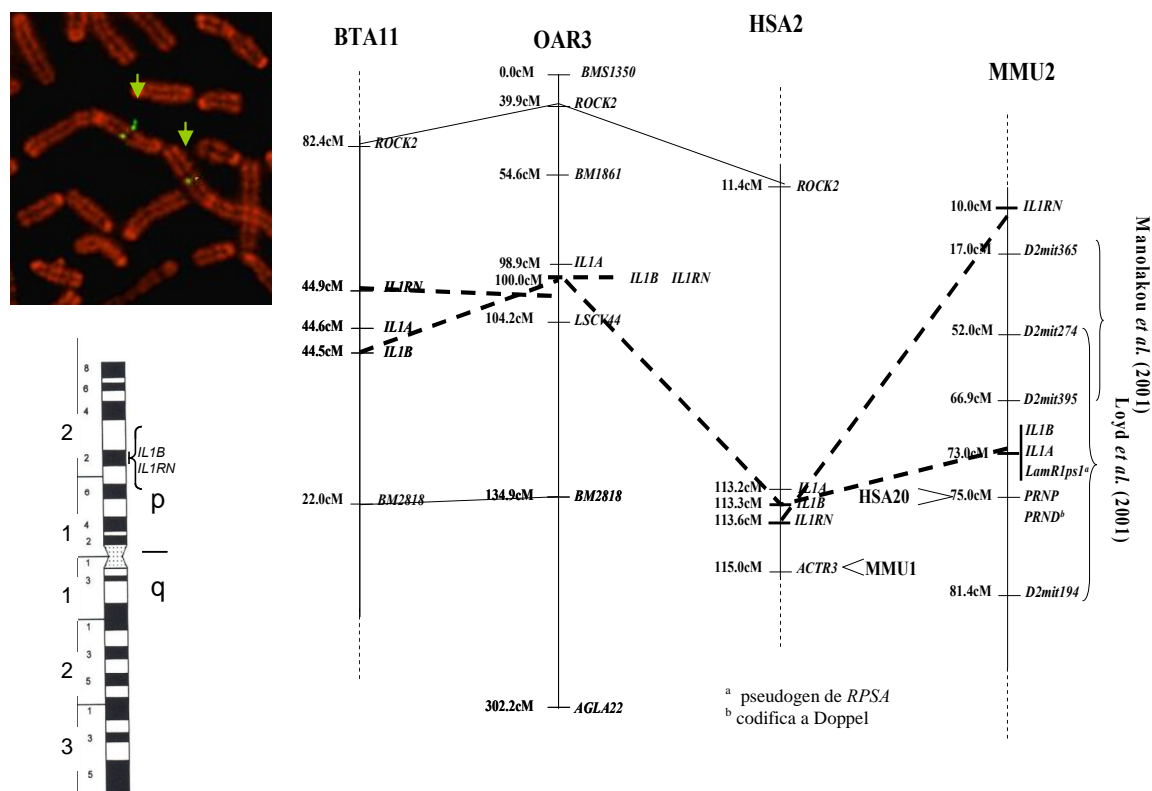


Fig. 27. Cartografiado de los genes ovinos *IL1B* e *IL1RN*. En la parte izquierda se muestran los resultados del FISH de *IL1RN* y un esquema del cromosoma 3 ovino (OAR3) donde puede verse con más detalle la localización de *IL1B* e *IL1RN* en OAR3p22. Los resultados del cartografiado genético y la homología con otras especies, en la parte derecha, señalan la posición de *IL1B* e *IL1RN* entre *IL1A* y *LSCV44*. Las llaves representan los intervalos QTL descritos en modelos murinos por Manolakou *et al.* 2000 y Lloyd *et al.* 2001.

IV.5.3. Caracterización parcial del gen *IL1RN* ovino

Con el fin de aislar y secuenciar el gen *IL1RN* ovino se diseñaron 10 cebadores heterólogos y 3 cebadores específicos a partir de las secuencias ovinas que se fueron aislando. En la Tabla 1 de Marcos-Carcavilla *et al.* (2007a) se muestran sólo aquellas parejas que produjeron resultados, las condiciones utilizadas y el tamaño de los fragmentos generados.

A partir de las secuencias obtenidas de muestras de ADN genómico, ADNc, fragmentos obtenidos mediante PCR sobre el DNA del BAC 387D1, o por secuenciación directa de éste, pudieron secuenciarse 4002 pb del gen, repartidas en cuatro secuencias de 2307 pb (DQ831949), 529 pb (DQ102853) y 1166 pb (DQ660409) y 282 pb del ARNm (DQ660408) que corresponden con secuencias codificantes comunes a las dos isoformas (Fig. 28).

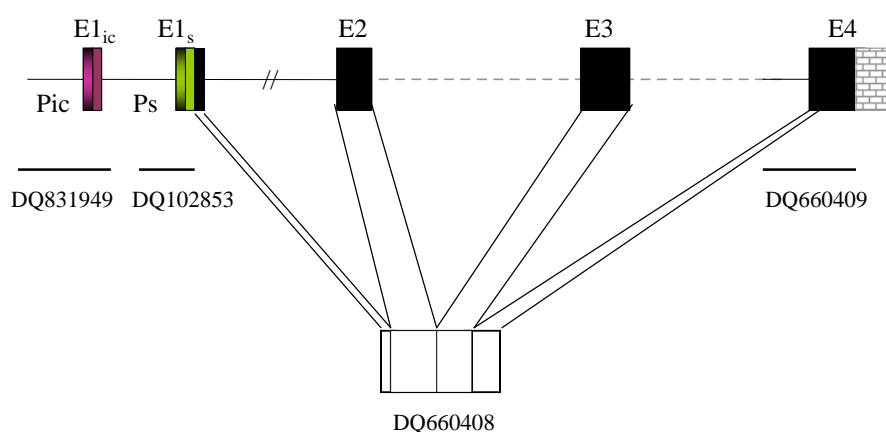


Fig. 28 Esquema de las secuencias del gen *IL1RN* aisladas en este trabajo. En negro se representan las regiones codificantes comunes a icIL-1Ra y sIL-1Ra. Los exones 1 específicos de cada una de estas isoformas (E1_{ic} y E1_s), se representan en rosa y verde, respectivamente. Las zonas difuminadas indican que esa región pertenece a la región 5'UTR:

La estructura del gen, incluyendo parte de la región 5', se determinó por comparación de las secuencias aisladas en este trabajo con las secuencias humanas (NM_173841), murinas (DQ282808) y bovinas (NW_205428 y NM_174357) depositadas en la base de datos del GenBank. Así se pudieron caracterizar 5 exones del gen *IL1RN* ovino (dos exones 1, según se exprese sIL-1rs o icIL-1Ra, y 3 exones comunes) y secuencias parciales de algunos de los intrones. La estructura detallada de las regiones aisladas gen ovino se explica detalladamente en Marcos-Carcavilla *et al.* (2007a).

Tras comparar distintas secuencias procedentes de la amplificación de las muestras ovinas descritas en los apartados III.2.1.1, III.2.1.3 y III.2.1.4, se encontraron dos SNPs y un Indels en el intrón 3 (ver secuencia DQ660409 en el anexo).

Puesto que no se encontró ningún polimorfismo que pudiese afectar a alguna región reguladora, en este caso, no se llevó a cabo el análisis de asociación

IV.5.4. Análisis de expresión

El análisis de expresión por PCR cuantitativa se realizó, para ambas citoquinas, como se describe en el apartado III.6.

Se encontraron diferencias significativas entre los animales enfermos y controles sólo en cerebelo ($p < 0.05$). Como se puede apreciar en la Fig. 29, los niveles de RNAm de IL1B e IL1RN son el doble en el grupo infectado de SC.

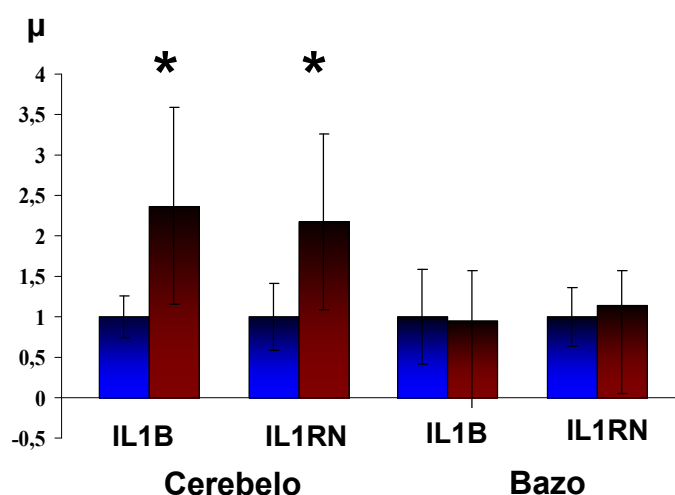


Fig. 29 Expresión relativa (unidades arbitrarias) de los genes *IL1B* e *IL1RN* en cerebelo y bazo de ovejas control (azul) e infectadas de SC (rojo). El eje y representa la media (μ). Las barras indican las desviaciones estándar. El grado de significación del análisis se indica como * ($p < 0.05$)

V. DISCUSIÓN

V.1 DISCUSIÓN SOBRE EL GEN *RPSA*

A pesar de los problemas derivados de la existencia de múltiples pseudogenes, el gen ovino *RPSA*, a excepción del intrón 3, pudo ser secuenciado y caracterizado. Las secuencias parciales de ADN y ARNm fueron depositadas en la base de datos del GenBank. Sus números de acceso son EF222474 y EF394773, respectivamente. La organización del gen ovino en 7 exones y 6 intrones corresponde con lo descrito en otras especies (Clausse *et al.* 1996; Jackers *et al.* 1996; Marcos-Carcavilla *et al.* accepted).

Por otra parte, teniendo en cuenta el número de trabajos que apuntan a LRP/LR como receptor de priones, que la región central de la PrP, que incluye el dominio directo de unión a LRP/LR (Fig. 14), es crucial en el proceso de transmisión (Kocisko *et al.* 1995; Priola *et al.* 1994), y que existen varios trabajos que apuntan a la existencia de otros factores, aparte de la secuencia de PrP, involucrados en la barrera de transmisión de priones entre distintas especies, se decidió comparar la secuencia aminoacídica de LRP/LR entre varias especies de mamíferos con distinta susceptibilidad a la infección (Castilla *et al.* 2004; Knorr *et al.* 2007; Lysek *et al.* 2005). Así, se comprobó que la secuencia proteica de LRP/LR está muy conservada, al menos dentro de la Clase de los mamíferos (Fig. 5 en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted). Sin embargo, las posiciones 241 y 272, que afectan al dominio indirecto de unión a PrP (180-285), así como la posición 290, presentan variaciones que, aunque no se ha podido confirmar en este trabajo, podrían afectar a la interacción LRP/LR-PrP^c/PrP^{sc}, pudiendo tener un papel importante en la barrera de transmisión de priones entre especies. A pesar de que los programas informáticos que se han empleado no han predicho ningún cambio importante en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas como consecuencia de estas variaciones, no se debe descartar la posibilidad de que cambios puntuales en la secuencia de LRP/LR puedan afectar a la conformación local o a la carga de la proteína e influir en la interacción LRP/LR-PrP^c/PrP^{sc} de especies diferentes. En este sentido, la Fig. 5 en Marcos-Carcavilla *et al.* accepted, sugiere que la treonina en posición 241 de LRP/LR concede resistencia a la infección natural por SC. Por tanto, sería interesante poder desarrollar estudios estructurales empleando técnicas cristalográficas y de resonancia magnética nuclear para poder comparar las interacciones entre LRP/LR y PrP^c/PrP^{sc} de distintos orígenes y así confirmar si alguno de estos cambios afectan realmente a la interacción entre estas dos proteínas.

Con respecto al cartografiado del gen, la localización de *RPSA* en OAR19q13, entre los marcadores CSSM06 y -2HF3B, es consistente con lo esperado mediante cartografía

comparativa con las especies humana (HSA3), murina (MMU9) y bovina (BTA22) (Fig. 9). La confirmación de esta posición al secuenciar los extremos del BAC refuerza este resultado. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el BAC 177E6 portase el gen funcional y/o un pseudogén próximo a éste, motivo por el cual el posicionamiento del gen ha resultado según lo previsto. En este sentido, es de destacar que en la genoteca del INRA el genoma ovino está representado por triplicado. De modo que, teniendo en cuenta que de la PCR que se desarrollo para hacer el primer cribado de la genoteca (Fig. 9) resultaron 5 SMs positivas y que al analizar la primera de ellas (SM9) surgieron dos BACs, cuyas direcciones fue imposible identificar, parece que la región del intrón 4 que estaba siendo analizada se encontraba contenida, al menos, en 6 BACs. Puesto que el gen debería estar representado un máximo de tres veces, es verosímil que hubiera uno o más pseudogenes no procesados de *RPSA* conteniendo el intrón 4. Una aproximación para aclarar este punto sería la secuenciación completa del inserto, que se espera llevar a cabo próximamente. Por otra parte, en lo Fig. 12 se muestra la región QTL implicada en el periodo de incubación a SC, descrita por Stephenson y cols. (2000) en el cromosoma 9 murino. Como ya se comentó anteriormente, el locus *RPSA* está fuera de dicho intervalo. Sin embargo, hay otros posibles genes candidatos presentes en esta región que por su función fisiológica y su localización cromosómica podrían constituirse genes candidatos tanto funcionales como posicionales. Estos son: *HSPA8* y *HSPB2* que codifican chaperonas de la familia de HSP70 y HSP27, respectivamente; *PID2* que según Stephenson podría contribuir al 13% de la varianza asociada al periodo de incubación a SC; *IL10RA* que codifica un receptor de la IL-10 y *BLR1* que participa en el desarrollo de las placas de Peyer.

En cuanto al estudio de asociación, aquí se analizó la región del gen *RPSA* que codifica los dos dominios de unión a PrP (Fig. 14) en una muestra de animales que presentaban distinta respuesta a la infección (sanos vs enfermos). Todas las mutaciones encontradas eran silentes. Hecho que no es sorprendente teniendo en cuenta la gran conservación de la secuencia aminoacídica hallada entre distintas especies de mamíferos (Fig. 5 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted). Sin embargo, sí se encontró asociación ($p < 0.05$) con un polimorfismo Indel que ponía de manifiesto la correlación entre presencia de un pseudogén de *RPSA* y una mayor resistencia a SC. Así, frente al 47% de los animales no portadores, el 70% de los animales portadores del pseudogén permanecieron sanos tras entrar en contacto con la enfermedad (Tabla1 de Marcos-Carcavilla *et al.* accepted). En este sentido, cada vez surgen más trabajos en los que se describen pseudogenes con funciones biológicas. En algunos casos, incluso, se ha visto que la presencia/ausencia de un determinado pseudogén puede relacionarse con enfermedades debido a una incorrecta regulación del gen del que proceden o bien por interaccionar de manera aberrante con otros componentes

celulares (Asano *et al.* 2004; Balakirev y Ayala 2003; Hirotsune *et al.* 2003). Por ello, sería interesante determinar la posición del pseudogén identificado en este trabajo y ver si ésta coincide con alguno de los intervalos QTLs descritos para el periodo de incubación a SC en ovino (Moreno *et al.* 2003a). Por otra parte, hay que tener presente que el análisis de la presencia/ausencia del pseudogén aquí encontrado muestra herencia dominante, por lo que no pudo determinarse el número de copias (una de cada parental) del mismo que portaban los animales heterocigotos para el polimorfismo Insdel (G) que indicaba la presencia de éste. Sería interesante poder determinar este hecho para poder inferir si en la posible respuesta a la infección debida a la presencia de este pseudogén también estaban contribuyendo el número de copias de éste. Sin embargo, hay que considerar la posibilidad de que el no haber detectado el pseudogén en el 40% de los animales se deba a que haya mutaciones en la secuencia del mismo que hayan impedido su amplificación. Esto habría que resolverlo diseñando cebadores específicos del pseudogén y llevando a cabo nuevas reacciones de PCR y secuenciación.

En relación a la existencia de múltiples pseudogenes de *RPSA*, su elevado número podría tener su explicación en los snoRNAs que residen dentro de los genes que codifican las proteínas ribosomales. Así, a lo largo de la evolución, los snoRNA se han ido propagando por duplicación, completa o parcial, del gen en el que se encuentran, pudiendo insertarse en diferentes posiciones de un mismo gen o en distintos genes al de origen (Zemann *et al.* 2006). Los resultados de un BLAT en el que se contrastó la secuencia de snoRNA E2 contra todo el genoma bovino (Fig. 12) hacen sospechar que este gen ha sufrido el proceso anteriormente descrito, pudiendo esta ser una explicación para los problemas que se han tenido durante el análisis del intrón 4.

Con respecto a los resultados del estudio de expresión, se ha demostrado que, tanto en eucariotas como en procariotas, la síntesis de proteínas ribosomales se regula, aunque no exclusivamente, a nivel traduccional (Mariottini y Amaldi 1990; Yenofsky *et al.* 1982; Yenofsky *et al.* 1983). La disminución de la cantidad de RNAm en cerebelo podría estar reflejando un aumento de la producción de LRP/LR a expensas del RNAm almacenado en el citosol. Por el contrario, y a pesar de que la replicación de priones suele ocurrir en bazo, no se detectó ningún cambio significativo en este tejido a pesar de que la mayoría de los animales infectados tenían depósitos de PrP^{sc} en este órgano. Adicionalmente, los animales analizados en el estudio de expresión fueron genotipados para detectar la presencia del pseudogén y determinar así de qué manera éste podría afectar a la expresión de *RPSA*. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, entre otras cosas debido al pequeño tamaño muestral. Por otra parte, con el fin de aclarar el mecanismo subyacente a la regulación de la expresión de LRP/LR como consecuencia de la infección por

SC, se analizaron, por *western blot*, homogeneizados de cerebro de ratones sanos e infectados con la cepa 22L. Los resultados obtenidos (apartado IV.1.8.2.) pudieran estar reflejando la producción de la forma madura, para compensar aquellas moléculas de LR que están siendo secuestradas por los priones entrantes, a expensas del RNAm y de LRP almacenados en el citoplasma. Sin embargo, hay que ser cautelosos a la hora de extraer conclusiones ya que éstos resultados contradicen observaciones previas (Rieger *et al.* 1997), que describen un aumento de la cantidad de LRP en ratones intracranealmente inoculados con SC. No obstante, la cepa de SC (C506M3) y el anticuerpo (Ra28/7) empleados en el estudio de Rieger y cols. eran distintos a los aquí utilizados. Debido al escaso número de muestras y a un posible efecto del procesado de las mismas, estos resultados deben tomarse con cautela, siendo interesante la repetición del experimento aumentando tamaño muestral.

Por último, para abordar el posible papel funcional que PrP^c y LRP/LR podrían desempeñar conjuntamente, se hizo un estudio utilizando varios modelos celulares que expresaban distintos niveles de PrP^c. Así, en primer lugar, se analizó la correlación entre las cantidades de estas dos proteínas sin poder establecer relación alguna entre ellas. A continuación, se intentó comprobar el comportamiento de LRP/LR a lo largo del proceso de diferenciación celular y se observó una correlación negativa entre las cantidades de ambas isoformas y la cantidad de PrP^c. Por el contrario, Baloui y cols. (2004) habían descrito que la presencia de LRP, en el cerebro de ratas adultas era menor que en el de ratas de seis días de edad, mientras que la cantidad de LR aumentaba con la edad de los animales. Pero hay que tener en cuenta que los modelos empleados en ambos estudios eran diferentes y que, en muchas ocasiones, los cultivos celulares no reflejan la realidad de un organismo. Además, se ha descrito la influencia de la densidad celular en la expresión en membrana de LR (Landowski *et al.* 1995), lo que podría haber influido también en los resultados aquí obtenidos. En definitiva, estos datos confirman que la expresión de LRP/LR es independiente de la de PrP^c. Sin embargo, no son suficientes para descartar un posible papel funcional de estas proteínas, de manera conjunta o independiente, en la diferenciación o en otros procesos celulares.

V.2. DISCUSIÓN SOBRE EL GEN *HSP90AA1*

El gen ovino *HSP90AA1* ha sido aislado, secuenciado y caracterizado. Las secuencias de ADN y ARNm inferidas en este trabajo han sido depositadas en la Base de datos del GenBank y sus números de acceso son DQ983231 y EF091713, respectivamente. La organización del gen en 6Kb que codifican una proteína de 733 aas es consistente con sus ortólogos bovinos, murinos y con la variante 1 descrita en humano (Fig. 30). Por otra parte, en la base de datos de genes humanos GENEATLAS (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>), se encontró que en esta especie el gen tiene 60Kb, dispuestas en 12 exones y 11 intrones, y que tiene varios lugares de inicio de la transcripción, lo que permite la síntesis de tres transcritos que codifican proteínas de entre 413 y 854 aas (Fig. 30).

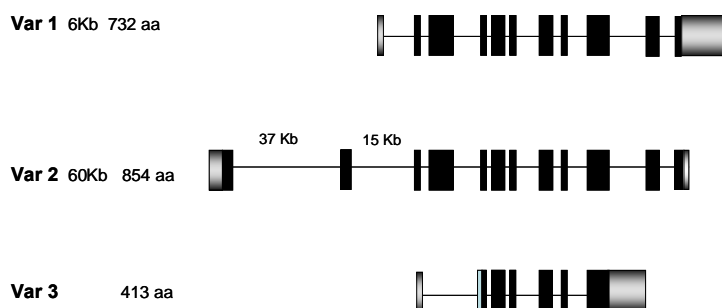


Fig. 30. Esquema de los distintos exones del gen *HSP90AA1* que codifican las tres variantes descritas en humano. Los cuadros negros y grises representan los exones codificantes y no codificantes, respectivamente. La secuencia aislada en ovino coincide con la variante 1 de humana descrita por Chen *et al.* (2005). Nótese que ésta última carece de un ácido glutámico (E) en la posición 266, por lo que la proteína final tiene un aminoácido menos que en las otras tres especies.

Buscando en las bases de datos del NCBI y del ENSEMBL, y utilizando los programas informáticos BLAST y BLAT, se intentó comprobar si el exón que permitía la síntesis de la variante de 854 aas estaba en otras especies. Sin embargo, sólo pudieron encontrarse secuencias de ARNm de esta variante en *Homo sapiens* (AK056446.1), *Pan troglodites* (XM_001161572.1) y *Macaca mulata* (XR_013338.1). No hubo ningún resultado en otras especies como el ratón, la rata o el perro, cuyos genomas ya han sido descifrados y están accesibles en la red. Esto sugiere que la variante 1 es exclusiva del Orden de los primates.

Algo similar ocurrió con la variante más pequeña de 413aas. Así, el único codon *stop* que aparece en el intrón 9 del gen en la secuencia ovina, bovina y murina, daría lugar a una proteína de 438, 409 y 422 aas, respectivamente. Asimismo, en la secuencia murina no aparece la señal de poliadenilación (AATAAA) y en las otras tres especies ésta ocupa una posición similar, de manera que parece poco probable la existencia de una variante ovina ya que sólo hay 9

nucleótidos de distancia ente el supuesto codón *stop* (TAA) y dicha señal. Además, en bovino, hay una transición G/C que origina un codon *stop* (TAG) prematuro originando una proteína de 409 aas (Fig. 31). Por otra parte, teniendo en cuenta el mayor tamaño del intrón 9 humano, y las distintas señales necesarias para el correcto procesamiento del ARNm (Zhang *et al.* 1999; Zhao *et al.* 1999), es probable que la variante de 413 aas no exista en las especies murina, ovina y bovina.

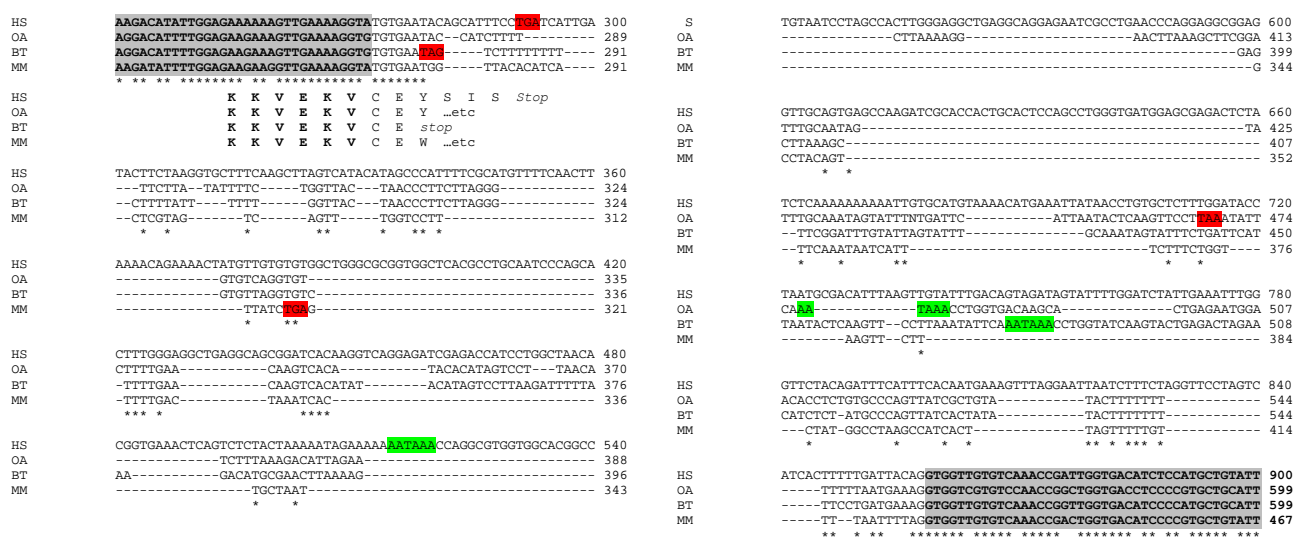


Fig. 31 Correspondencia de la región del gen *HSP90A1* humano que codifica la variante proteica 2 con las especies ovina, bovina y murina. Los exones 9 y 10 se resaltan en gris. Como muestra la figura, los 6 últimos aas de la variante humana de 413aas están codificados en el intrón 9. En esta especie, el intrón 9 tiene más de 300 nucleótidos adicionales que sus homólogos ruminantes y murino. Las señales de *stop* y de poliadenilación se indican en rojo y verde, respectivamente.

Atendiendo a la posición que *HSP90A1* ocupa en el genoma ovino, la localización de este gen en OAR18qdist, a continuación del marcador VNTR16, es consistente con lo pronosticado por cartografía comparativa con las especies humana (HSA14), murina, (MMU12) y bovina (BTA21). Es de destacar que el cromosoma 21 bovino y la región del cromosoma 18 ovino y del 12 murino en las que se encuentra el gen *HSP90A1*, habían sido descritas como regiones QTL relacionadas con el periodo de incubación del SC y de la EEB (Lloyd *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2003a; Murdoch *et al.* 2007). En la Fig. 22 se representa un esquema de la región QTL descrita por Lloyd y cols. (2001) en un modelo murino. Ahí se puede apreciar que en la región propuesta hay al menos tres posibles loci que pudieran estar influyendo en la varianza poligénica asociada al periodo de incubación a SC: dos de ellos, *PRPL3* y *PRDT4*, previamente descritos como posibles genes candidatos (Lloyd *et al.* 2001; Yehiely *et al.* 1997) y el aquí estudiado, *HSP90A1*. Según esta figura, en una distancia de 10 cM hay tres picos QTL y el locus

HSP90AA1 está incluido en uno de ellos, distinto del que engloba los loci *PRPL3* y *PRDT4*. Esto refuerza la hipótesis del gen *HSP90AA1* como un candidato posicional en la respuesta a SC.

Con el objetivo de ver si había mutaciones en el gen que pudieran estar afectando a su expresión, y por tanto asociados a la enfermedad, se analizaron los polimorfismos de las regiones 5' y 3' flanqueante. Los posibles elementos reguladores que podían verse afectados por alguno estos SNPs se resumen en Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b (Fig1). Finalmente, Tras descartar aquellos genotipos que mostraban frecuencias alélicas extremas, sólo cuatro SNPs de la región 5' flanqueante (posiciones: -660, -528, -524, y -468) y seis del intrón 10 (posiciones: 40, 165, 178, 205, 220 y 239) fueron incluidos en el análisis de asociación. Los resultados fueron significativos para las sustituciones C/G y A/G en -660 y -528 ($p < 0.001$) y para los seis SNPs ligados (A/G C/T C/G C/G C/T C/T) del intrón 10 ($p < 0.01$). Se confirmó que no existía ligamiento entre los dos SNPs de la región 5' flanqueante y los 6 del intrón 10. En Marcos-Carcavilla *et al.* 2007b se detallan las frecuencias genotípicas de los SNPs analizados en estas dos regiones en animales de las razas Rasa Aragonesa, Manchega y Assaf. A pesar de que en este estudio no fueron detectados, recientemente se han identificado animales con genotipo homocigoto AA TT AA TT CC CC en nuevos genotipados que se están llevando a cabo para ampliar el estudio de este gen. Puesto que no hay diferencias entre los genotipos encontrados en la raza Rasa Aragonesa y los genotipos presentes en Manchega y Assaf, los resultados aquí estimados podría extrapolarse a otras razas. Según éstos, los animales con genotipos CC AA y GG CC GG CC TT TT, para las posiciones descritas en la región 5' y en el intrón 10, estarían asociados a una mayor resistencia a SC. Así, con respecto a la región 5' flanqueante, mutaciones en alguno de estos elementos podrían afectar a la expresión del gen debido a interacciones positivas y/o negativas que pudieran producirse entre los distintos factores de transcripción. Por otra parte, se ha descrito la importancia del último intrón en la eficiencia de formación del extremo 3' del RNAm (Nesic y Maquat 1994). De modo que es posible que alguna de las mutaciones encontradas en el intrón 10 influya en la regulación a nivel post-transcripcional. Por lo que, en ambos casos, podría verse afectada la cantidad final de Hsp90 α sintetizada. De este modo, podría ocurrir que tras la infección, aquellos animales capaces de producir más cantidad de proteína mostrasen una menor disminución de la actividad proteosomal. En consecuencia, el proceso de conversión y acumulación de PrP^{sc} estaría ralentizado porque la PrP^c sería debidamente degradada, dando lugar a un periodo de incubación mayor. Por ello, sería interesante comprobar si las distintas combinaciones de genotipos para estas regiones influyen, de manera aditiva, sobre el periodo de incubación de la enfermedad.

Con respecto al estudio de expresión, éste indica que el SC, como fenómeno patológico, no induce cambios en la expresión del gen *HSP90AA1* en los tejidos analizados (bazo y cerebelo). De manera que la hipótesis planteada en el apartado IV.3. parece verosímil. Así, como consecuencia de la acumulación de PrP^{sc} en el interior celular, la Hsp90 dejará de lado otras funciones para intentar paliar el daño ocasionado por la acumulación de proteínas en un estado conformacional aberrante. En consecuencia, HSF1 pasará a su forma activa, favoreciendo la expresión de genes de estrés, y la actividad proteosomal se verá reducida. Como resultado, el resto de las proteínas celulares que se degrada por esta vía, entre ellas la propia PrP^c, se irán acumulando en el citosol, aumentando la cantidad de sustrato susceptible de ser transformado a PrP^{sc}, lo que favorecerá la producción de más partículas priónicas acelerando el proceso. Sin embargo, hay que considerar tres puntos importantes:

- 1- No puede descartarse la existencia de variación en otros tejidos.
- 2- Puede que haya alguna variante que no haya podido detectarse con las parejas de cebadores utilizadas.
- 3- Teniendo en cuenta que cuando la expresión de Hsps es prolongada, la síntesis de estas proteínas se regula post-traduccionalmente (Jacquier-Sarlin *et al.* 1995), el aumento de la producción de Hsp90α durante la enfermedad podría deberse a un aumento en la traducción de RNAm almacenado en la célula. Considerando que los niveles de RNAm, en animales enfermos, descienden un 10% y un 20% en cerebelo y bazo, respectivamente (Fig. 23), esta hipótesis parece verosímil.

Adicionalmente, para determinar si verdaderamente los ocho polimorfismos que mostraron asociación con la resistencia/susceptibilidad a SC influían en la expresión del gen, los 13 animales analizados en el estudio de expresión fueron genotipados para estos SNPs. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, entre otras cosas debido al pequeño tamaño muestral.

V.3. DISCUSIÓN SOBRE LOS GENES *IL1B* E *IL1RN*

Los genes ovinos *IL1B* e *IL1RN* han sido parcialmente aislados y caracterizados. Las secuencias de ADN y ARNm inferidas en este trabajo han sido depositadas en la Base de datos del GenBank y sus números de acceso son los descritos en los apartados IV.4.3. y IV.5.3., respectivamente. La organización de ambos genes es consistente con sus homólogos en otras especies.

En lo referente a la proteína que codifican, la secuencia peptídica de IL-1 β está poco conservada. Así, mientras que la homología entre especies de rumiantes es entorno al 95%, con otras especies más alejadas filogenéticamente (humana, canina, felina, cunícola...) ronda el 75%. En concreto, la región codificante de *IL1B* caracterizada en este trabajo contiene la información necesaria para codificar 137 de los 266 aas que conforman su homólogo bovino. Es interesante señalar que las diferencias en el número de nucleótidos en los exones 3, 4, y 5, entre las especies ovina, bovina y humana, se traducen en diferencias en el número de aminoácidos de la proteína (Fig. 32).

```

OA      MATVPEPINEVMAYYS-DENELLFEVDGPKQMKSCQHLDLGSMGDGNIQLQISHQLYNK 59
BT      MATVPEPINEMMAYYS-DENELLFEADDPKQMKSCIQHLDLGSMGDGNIQLQISHQFYNK 59
HS      MAEVPELASEMMAYYSGNEDDLFFEADGPKQMKCSFQDLDLCLPL-DGGIQLRISDHHSYK 59
      *** ** .*:***** :*:***** .*:***** .*:***** .*:***** :*:*****
      OA      SFRQVVSIVAMEKLRSR--AYEHVFRDDDLRSILSFIFEEEPVIFETSSDE-LLCDAAV 116
      BT      SFRQVVSIVAMEKLRSN--AYAHVFHDDDLRSILSFIFEEEPVIFETSSDE-FLCDAPV 116
      HS      GFRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIIEEEPIFFDTWDNEAYVHDAPV 119
      .***.***:***:***. . :*:***** :*:***** :*:***** :*:***** :*:*****
      OA      QSVKCKLQDREQKSLVLDSPCVLKALHLPSQEMSREVVFCMSFVQGEERDNKIPVALGIR 176
      BT      QSIKCKLQDREQKSLVLASPCVLKALHLLSQEMNREVVFMSFVQGEERDNKIPVALGIK 176
      HS      RSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVALGLK 179
      :*:***** :*:***** :*:***** :*:***** :*:***** :*:***** :*:*****
      OA      DKNLYLSCVKKGDTPTLQLEEVDPKVYPKRNMEKRFVFKTEIKNTVEFESVLYPNWYIS 236
      BT      DKNLYLSCVKKGDTPTLQLEEVDPKVYPKRNMEKRFVFKTEIKNTVEFESVLYPNWYIS 236
      HS      EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFSAQFPNWYIS 239
      :***** * . * .***** .***** :***** * * :* . :***** :*****
      OA      TSQIEEKPVFLGRFRGGQDITDFRMTLSP 266
      BT      TSQIEERPVLGHFRAGQDITDFRMTLSP 266
      HS      TSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS 269
      *** * :***** : .***** * :* .

```

Fig. 32 Comparación de la secuencia aminoacídica de IL-1 β entre las especies bovina (AAA30585) y humana (NP_000567) con una secuencia ovina completa hallada en la base de datos (emb|CAA40293.1|). Se resalta la secuencia que ha sido previamente descrita en las especies bovina y ovina como péptido señal (NP_1776518 y AAA30584 respectivamente), cuya función es la de dirigir la proteína a su correcta localización celular.

Con respecto a IL-1Ra, se han descrito un total de 4 isoformas. En la Tabla 8 se resumen las secuencias de cada una de ellas, teniendo como referencia la secuencia de 177 aas, correspondiente a la variante 1, representada en la Fig. 33.

Tabla 8 Resumen de las distintas isoformas de IL-1Ra descritas en humano

	Identificación	Localización	De-a	Secuencia en var1 que cambia	por	Longitud
Var1	P18510-1	Extracelular				177aas
Var2	P18510-2	Citoplásmica	1-21	MEICRGLRSHLITLLLFLFH	MAL	159aas
Var3	P18510-3	Citoplásmica	1-21	MEICRGLRSHLITLLLFLFH	MALADLYEEGGGGGEGEDNADSK	180aas
Var4	P18510-4	Citoplásmica	1-34	MEICRGLRSHLITLLLFLFHSETICRPSGRKSSK	nada	143aas

La región codificante caracterizada en este trabajo engloba 5 exones que portan la información necesaria para codificar las variantes 1, 2 y 4 (faltando los 23 últimos aas). En la Fig. 33 se comparan las secuencias ovina, bovina y humana correspondientes a la primera variante. Sin embargo, los nucleótidos que codifican la región específica de la variante 3 humana (Tabla 8)

sólo han podido identificarse en chimpancé. Pudiera ocurrir, como en el caso de las distintas isoformas de la Hsp90 α , que la variante 3 de IL-1Ra sea exclusiva del Orden de los primates.

```

BT      MDIY--IHGYLICLLFLFRSETACHPLGKRRCMQAFRIWDVNQKIFYLRNNQLVAGYL 58
OA      MDIY--IHGYLICLLFLFHSETACHPLGKRRCMQAFRIWDVNQKIFYLRNNQLVAGYL 58
HS      MEICRGLRSHLITLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYL 60
          * *          ** ***** * * *          *****
          * *          ** ***** * * *          *****

BT      QGPNTKLEEKIDVVPVIEPHTMFLGIHGGKCLACVKSGDEIKLKLEAVNITDLNQNRQD 118
OA      QEANIKLEEKIDVVPVIEPHTMFLGIHGGKCLACVKSGDEIKLKLEAVNITDLNQNRQD 118
HS      QGPNVNLEEKIDVVPVIEPHALFLGIHGGKMCCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENKQD 120
          * *          ***** * * *          *****

BT      KRFAFIRFDNGPTTSFESAACPGWFLCTSLQADQPVGLTNMPTEALKVTKFYFQD- 174
OA      KRFAFIRSDNGPTTSFESAACPGWFLCTSLQADQPV----- 154
HS      KRFAFIRSDGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQDE 177
          ***** * *****

```

Fig. 33 Comparación de las secuencias bovina (NM_174357) y humana (P18510-1), correspondientes a IL-1Ra var 1, con la región codificante aislada en este trabajo. En gris se indica el péptido señal. Los asteriscos señalan homología entre las tres especies. Es de destacar que la proteína humana (variante 1) posee una arginina (R), una glicina (G) y un ácido glutámico (E) en las posiciones 5, 6 y 177, que no aparecen en las especies de rumiantes.

Con respecto a la posición que *IL1B* e *IL1RN* ocupan en el genoma ovino, la localización de ambos genes en OAR3p22, entre los marcadores *IL1A* y *LSCV44*, es consistente con lo pronosticado por cartografía comparativa con las especies humana (HSA2), murina (MMU2) y bovina (BTA11). Es interesante destacar que en humano y ovino, los genes *IL1B* e *IL1RN* se encuentran muy juntos, a menos de 1 cM el uno del otro. Sin embargo, en ratón están separados por una distancia de 63 cM, lo que hace que no coincidan bajo la misma región QTL murina descrita para el periodo de incubación a SC. En la Fig. 27 puede apreciarse que, a pesar de la gran distancia entre estos dos loci en esta última especie, el locus *IL1B* coincide con la región descrita por Lloyd y cols. (2001) y el locus *IL1RN* esta muy próximo al descrito por Manolakou y cols. (2001) en un modelo de EEB. También hay que considerar que a 2 cM de *IL1B* se encuentran los loci *PRNP*, *PRND*, que es parálogo del primero que codifica la proteína Doppel, y *LamR1ps1*, que pertenece a la familia de pseudogenes de *RPSA*. A pesar de que en el estudio de Lloyd y cols. (2001) no se encontró ninguna diferencia aminoacídica en las secuencias de PrP^c y Doppel de las líneas murinas estudiadas, estos mismos autores no descartan la posibilidad de que mutaciones en regiones reguladoras de estos genes puedan explicar el intervalo QTL detectado en MMU2. Sin embargo, en ovino, los loci *PRNP* y *PRND* se encuentran en OAR20, mientras que las regiones QTL descritas en esta especie se encuentra en OAR3 y OAR18 (Moreno *et al.* 2003a). Puesto que en este trabajo se ha determinado la localización de *IL1B* e *IL1RN* en OAR3, queda justificada la elección de estos genes como candidatos posicionales, distintos del *PRNP*, implicados en la regulación del periodo de incubación a SC. La posible importancia del locus *LamR1ps1* se discute en el apartado VI.

Por otra parte, como ya se ha explicado anteriormente, una mala regulación de la producción de citoquinas puede tener fatales consecuencia para la supervivencia celular. Por ello, el análisis de asociación se llevó a cabo analizando los polimorfismos encontrados en las regiones reguladoras descritas por Kominato *et al.* (1995), Hiscott *et al.* (1993), Hunninghake *et al.* (1992), Shirakawa *et al.* (1993) y Tsukada *et al.* (1994) en la especie humana. De todos los polimorfismos hallados en estas regiones, el análisis de asociación sólo resultó significativo para la transversión C/G en la posición -1257 del punto de inicio de la transcripción. Puesto que este SNP no parece dañar la interacción con ningún factor de transcripción, pudiera ocurrir que se encontrase en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Para poder aclarar este punto, sería interesante aumentar la región analizada en esta misma muestra de animales y confirmar la existencia otra(s) mutación que pudiera ser la verdadera responsable de la distinta respuesta a la infección.

Con respecto al gen *ILRN*, no se encontró ninguna mutación que afectase a alguno de los elementos reguladores predichos. Sin embargo, en la búsqueda preliminar de polimorfismos que se llevó a cabo se encontraron 2 SNPs y un Indel en el intrón 3. Puesto que éste es el último intrón del gen, de igual manera que en el caso de *HSP90AA1*, es posible que alguna de estas mutaciones tenga importancia en la regulación postranscripcional de *ILRN*. Para poder verificar esta hipótesis habría que secuenciar estos polimorfismos en las muestras utilizadas para el análisis de asociación.

En lo que concierne a los resultados del análisis de expresión, éstos coinciden con trabajos previos (Campbell *et al.* 1994; Cunningham *et al.* 2005) que determinan el perfil de expresión de estas citoquinas en cerebro y varios órganos periféricos (bazo, hígado y riñón) de animales infectados con SC, y que revelan un patrón alterado asociado únicamente al sistema nervioso. No obstante, puesto que en condiciones normales, el ratio IL-1Ra/IL-1 β es 1 (Vamvakopoulos *et al.* 2002) y que en los animales que aquí se han estudiado este ratio no cambia con la infección por SC, la bioactividad de IL-1 β podría estar siendo contrarestada con una mayor producción de su antagonista.

Adicionalmente, los animales analizados en el estudio de expresión fueron genotipados para analizar las regiones reguladoras de los genes *IL1B* e *IL1RN* para determinar así se verdaderamente éstos influían en la expresión del gen. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, entre otras cosas debido al pequeño tamaño muestral.

VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES/ GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS

A pesar de las medidas de control, las pérdidas económicas debidas a las enfermedades infecciosas continúan afectando a la industria ganadera. La aparición de nuevos patógenos, ligado a los nuevos sistemas de producción, es un fenómeno que surge en las últimas décadas, un ejemplo de ello es el brote de enfermedades priónicas, entre las que destaca el SC ovino.

Hasta ahora existen dos formas de atajar las EETs, la primera, consiste en la intervención en los estadios iniciales a través de los que PrP^{sc} entra en el organismo y es transportada al cerebro, esto es así pues hasta la fecha, no se ha encontrado ningún fármaco con el que combatir estas enfermedades, evitando así la muerte de los animales y su posible transmisión al hombre. La segunda consiste en la selección genética de animales resistentes que podría constituir una alternativa a este problema. No obstante, los estudios desarrollados hasta el momento revelan que no existe resistencia total a la infección por priones. Así, se ha demostrado que hay especies que sucumben fácilmente a la infección (oveja, cabra, etc), y aquellas consideradas resistentes (cerdo, conejo, etc), que sólo se infectan con determinadas cepas y/o en condiciones muy concretas (inoculación intracraneal, altas dosis de priones, etc). Con estos antecedentes, en el estudio de las EETs, es fundamental tener siempre presente las siguientes consideraciones:

1- La selección de animales portadores de alelos de resistencia no tiene mucho sentido, puesto que, de momento, no se tiene la certeza de la existencia de ningún genotipo que confiera resistencia total frente a las distintas cepas de priones. Por tanto, habría que referirse a variantes génicas que, por otorgar mejores mecanismos de defensa contra la entrada de priones y/o contra la acumulación de placas amiloides, confieren mayores periodos de incubación. En consecuencia, los esquemas de selección que se están llevando a cabo en muchos países, entre los que se incluye España, no son acertados, ya que conducen a la disminución de la variabilidad genética, del gen *PRNP* y de todas aquellas regiones génicas en desequilibrio de ligamiento con éste, que podría repercutir negativamente si aparecen nuevas cepas frente a las que estos animales fuesen susceptibles. Por otra parte se agravaría la situación, si en los animales seleccionados se hiciese difícil la detección de priones, pudiendo aquellos actuar como reservorios, favoreciendo así la diseminación de estos agentes.

2- Los estudios que se están realizando en modelos animales, cuya finalidad principal es poder desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de EETs y otras neuropatías que afectan al hombre, son fundamentales para poder entender los mecanismos utilizados por los priones para entrar y propagarse por el organismo.

En este sentido, las enfermedades priónicas muestran similitudes con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson. Sin embargo, las EETs no sólo se centran en el SNC, sino que la acumulación de PrP^{sc} también tiene lugar en bazo y en otros órganos periféricos; aunque, a diferencia de lo que ocurre en el SNC, altas concentraciones de priones en el sistema linfóide no causan daños histopatológicos (Clarke y Haig, 1971; Dickinson et al. 1972). Se ha establecido que la sola presencia de PrP^{sc} no causa destrucción neuronal y que si se detiene la expresión de PrP^c durante el transcurso de la enfermedad, la infección cesa y el organismo se recupera (Mallucci et al. 2003), de modo que el daño que los priones causan específicamente a las neuronas puede explicarse atendiendo a las características del SN, que es rico en metales y ácidos grasos insaturados que son propensos a la oxidación (Halliwell 1992). Además, el alto contenido lipídico y el metabolismo aerobio, propios de este tejido, hacen que el SN sea especialmente susceptible al daño por radicales libres de oxígeno (Dawson and Dawson 1996). También hay que considerar que la gran especialización de las neuronas ha podido repercutir en una menor capacidad de éstas para combatir los problemas derivados de la acumulación de agregados proteicos (estrés oxidativo, compuestos neurotóxicos...).

Cada vez son más las evidencias que señalan a la glía asociada a las placas amiloides, y a las citoquinas producidas por la glía, como factores fundamentales en el desarrollo de los cambios neuropatológicos y en la progresión de desórdenes neurodegenerativos, entre los que se incluyen las EETs. Un experimento llevado a cabo en un modelo de hámster infectado con la cepa de SC 263K ha permitido dilucidar que la causa principal de la pérdida neuronal, inherente a esta enfermedad priónica, podría ser el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Choi et al. 1998).

Por todo ello, es concebible que las proteínas codificadas por los cuatro genes aquí estudiados desempeñen algún papel en distintos aspectos de la enfermedad, incluyendo la entrada de PrP^{sc} en la célula (*RPSA*), la respuesta contra la acumulación anómala de proteínas (*HSP90AA1*), así como en la respuesta inflamatoria local que podría contribuir a potenciar el daño neuronal (*HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN*).

Así pues, LRP/LR podría impedir la entrada de determinadas cepas priónicas e influir en el mecanismo de propagación y/o de muerte celular. Se ha demostrado que este receptor interviene en la endocitosis de priones de EEB, por parte de los enterocitos humanos, durante la infección por vía oral (Morel et al. 2005). También se ha probado que tratamientos con agentes que interfieren con los HSPGs, que parecen actuar como co-factores/co-receptores de LRP/LR en el

metabolismo de PrP^c y en la propagación de priones (Adjou et al. 2003; Gauczynski et al. 2001; Horonchik et al. 2005; Hundt et al. 2001; Leucht et al. 2003; Morel et al. 2005; Rieger et al. 1997; Vana and Weiss 2006), constituyen una de las mejores terapias en modelos experimentales de enfermedades priónicas. No obstante, LRP/LR es sólo responsable del 25-50% de la internalización de la PrP^c desde la membrana (Gauczynski et al 2001b), lo que es consistente con la posible participación de otras proteínas en el proceso de infección y propagación celular de PrP^{sc} (Lee et al. 2003), de forma que esclarecer el resto de las vías empleadas por estos agentes, para infectar y propagarse por el organismo, constituye un factor clave para poder desarrollar mejores programas de control y nuevas terapias. Es vital entender que atacar el punto de entrada de los priones resulta la manera más efectiva de poder conseguir animales resistentes, porque una vez el prión ha accedido a las células, antes o después, la enfermedad acaba desarrollándose. También hay que considerar que las diferencias interindividuales en la producción, acumulación en la membrana celular, o secreción al medio de este receptor, así como mutaciones en la secuencia de LRP/LR que afecten a la interacción con PrP^{sc}, puedan influir en la variabilidad de la respuesta a la infección por SC. En este sentido, se ha descrito que aquellas células que presentan más cantidad de receptor en la membrana también secretan más LR al exterior y que LR en el medio extracelular sigue manteniendo su capacidad de unir laminina (Karpatova et al. 1996). Puesto que el dominio de unión a laminina y a PrP es compartido, aquellas células que secreten más LR al medio podrían tener más capacidad de bloquear la infección, al secuestrar a los priones e impedir su interacción con las formas de receptor asociadas a la membrana. Asimismo se han detectado por *western blot* bandas de pesos moleculares que oscilan entre 60-80 y 116-200 kDa que pudieran estar relacionadas con LRP/LR (Buto et al. 1998; Simoneau et al. 2003), de manera que sería interesante demostrar si las distintas formas de este receptor son específicas de algún tipo o compartimento celular y si muestran distintas afinidades para unir PrP^c. En relación a esto, Baloui y cols. (2004) describieron que LR se encuentra principalmente en las regiones cerebrales asociadas con la neurodegeneración propia de las EETs, y que la expresión de LRP está restringida a un tipo de neuronas particularmente sensibles a la acumulación de priones. De modo que, el estricto control de la localización de LRP/LR parece ser crucial para las neuronas del SNC (Baloui et al. 2004).

Por otra parte, la respuesta celular frente al estrés, como el causado por la acumulación de priones, comprende distintos eventos de señalización, activación y síntesis de proteínas de estrés, entre las que se encuentran las chaperonas. Éstas forman complejos macromoleculares y poseen un elevado número de co-chaperonas que regulan su actividad, su unión a otras proteínas y su función. Existen dos vías principales de actuación, según su localización relativa en el

organismo. Las chaperonas intercelulares ejercen un papel de citoprotección uniéndose a proteínas inmaduras, mal conformadas y/o desnaturalizadas en respuesta a estímulos de estrés. Sin embargo, los estímulos de estrés también inducen la secreción de chaperonas que cumplen funciones citoestimuladoras al iniciar respuestas de tipo inmune (Asea 2006).

A pesar de que parece imprescindible la intervención de diferentes chaperonas en múltiples etapas de los procesos de conversión, propagación, eliminación de PrP^{sc} e incluso de muerte neuronal, aún no se ha podido esclarecer la identidad de éstas ni las reacciones en las que intervienen. Hay evidencias que indican que el balance de los distintos componentes de los complejos que forman las chaperonas es un factor clave en la regulación de la propagación de priones. Así, en función del ratio chaperona-ligando, éstas pueden tanto neutralizar como activar los procesos de agregación (Soti y Csermely 2002). Además, las chaperonas regulan redes en las que interaccionan varias proteínas y pueden ser importantes elementos a la hora de promover la comunicación entre distintas redes de señalización. También son fundamentales en la estabilización de las membranas, el mantenimiento de la homeostasis redox, la protección de la integridad del ADN en condiciones de estrés ambiental y la regulación de redes de transcripción. Consiguientemente, cuando las células sufren estrés, las chaperonas desvían sus esfuerzos hacia la estabilización de las proteínas dañadas. Esto, en combinación con la translocación al núcleo de algunas de ellas, puede dar lugar a la desarticulación de las redes en las que participan afectando al destino de la célula. Un ejemplo de esto es la hipótesis planteada en el apartado 1.3, en el que se hace referencia a las consecuencias que la acumulación de agregados protéicos pueden tener, al favorecer la activación de HSF-1 y la desestabilización del proteosoma como resultado de la competencia de PrP^{sc} para unirse a Hsp90. Por tanto, las rutas de respuesta a estrés, en ocasiones, van acompañadas de “daños colaterales” que pueden resultar tóxicos, particularmente si son estimuladas de manera continuada. Es más, se sabe que algunas chaperonas son capaces de inducir multitud de respuestas inmunes, incluyendo la liberación de citoquinas como la IL-1 β , óxido nítrico y quimioquinas.

Hasta la fecha se había considerado al SNC como “privilegiado”, por no contribuir ni sucumbir a la inflamación. No obstante, hoy se sabe que el SNC muestra signos inflamatorios, y que en respuesta al daño, infección o enfermedad, las células del SNC generan moléculas inflamatorias, entre las que se incluyen las citoquinas proinflamatorias, las prostaglandinas, y los radicales libres, que en definitiva inducen quimioquinas y moléculas de adhesión, reclutan células del sistema inmune, y activan las células gliales (Lucas et al. 2006). Las funciones de la glía son controladas por la comunicación mediada por citoquinas, quimioquinas, factores tróficos, y otras

moléculas neuromoduladoras entre las neuronas, los astrocitos y la microglía. Las citoquinas son factores solubles polipeptídicos que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células de los sistemas inmune y hematopoyético. Desempeñan acciones de tipo pleiotrópico, complementario y compensatorio; cada una de ellas ejerce múltiples efectos en distintas células, y distintos factores pueden actuar sobre el mismo tipo celular para desencadenar respuestas similares u opuestas (Swada et al. 1995). Así, las señales originadas por las citoquinas se propagan a través de las proyecciones neuronales y de rutas de difusión extracelular y son subsumidas en cascadas moleculares que se ha propuesto forman sistemas de retroalimentación autocrina-paracrina-yuxtacrina en el cerebro (Vitkovic et al. 2000). Además, estas cascadas incluyen algunos pasos potencialmente neurotóxicos, entre los que destacan el aumento de la concentración intraneuronal de calcio, y de los niveles de óxido nítrico y radicales libres en los tejidos, lo que desencadena el daño oxidativo. La familia IL-1, a la que pertenecen IL-1 β e IL-1Ra, participa en la activación de muchas de estas redes moleculares.

En general, la compleja interacción entre chaperonas, moléculas inflamatorias, el fondo genético del individuo, y los factores ambientales a los que éste se ve sometido, puede, en definitiva, regular el resultado del daño en el SNC y la progresión de la neurodegeneración crónica, como la que tiene lugar en las enfermedades priónicas. Por otro lado, la propagación de las señales de las citoquinas y las chaperonas por el cerebro es importante, ya que la hiperactivación de la microglía debida al fallo en estas redes de señalización podría favorecer o causar la neurodegeneración. En este sentido, aunque aún son muchas las incógnitas, la comunidad científica empieza a tener conciencia de los reajustes que se producen como consecuencia del estrés en las distintas redes de comunicación inter y extracelular, así como de los mecanismos que ayudan a las células a preservar la robustez en estas condiciones (Szalay et al. 2007). Conocer estas interacciones en mayor profundidad, ayudará al desarrollo de terapias efectivas y de esquemas de mejora para el hombre y la ganadería, respectivamente.

En este trabajo se ha estudiado la posible implicación de los genes *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN* en la varianza poligénica asociada con la distinta resistencia/susceptibilidad a la infección por SC en ovino. En referencia a este estudio, es crucial tener en cuenta que las muestras animales empleadas en el análisis de asociación, a pesar de ser todas de raza Rasa Aragonesa y presentar igual genotipo de *PRNP* (*ARQ/ARQ*), pertenecían a rebaños diferentes. En concreto, los 31 animales designados como “enfermos” mostraban signos clínicos e histopatológicos de la enfermedad y pertenecían a seis rebaños distintos, mientras que los otros 51 (sanos), a pesar de provenir de un rebaño en el que se había detectado la presencia de SC, no mostraban ningún

síntoma. Estos animales no presentaban depósitos de PrP^{sc} ni síntomas clínicos, sin embargo, no puede descartarse la aparición de dichos signos con periodos de incubación mayores, por lo que hay que ser cauteloso a la hora de considerar a los animales que han sido designados como “sanos” en el estudio de asociación ya que pudieran ocurrir dos cosas: 1) que no sean verdaderamente resistentes, sino que simplemente sean más tolerantes y desarrollen la enfermedad más lentamente que los animales aquí considerados como “sensibles”, o 2) que, a pesar de pertenecer a focos de SC, no llegaron a estar en contacto con el prión, o lo hicieron con títulos insuficientes. Además, se desconocía la información relativa al periodo de incubación de los animales utilizados en este estudio. Lo único que se sabía era su status con respecto a la enfermedad (sano vs enfermo). Por consiguiente, puede que haya habido algún polimorfismo, que estuviese asociado con el periodo de incubación, y cuya asociación con la enfermedad haya sido pasada por alto al no contar con una muestra de animales adecuada. Asimismo hay que tener presente que los resultados de expresión en ovino se han basado en los niveles de RNAm extraído de bazo y cerebelo, pudiendo haber otros tejidos, órganos y/o regiones del cerebro en los que estos genes se comporten de manera diferente. Por último, tampoco hay que olvidar la posible existencia de otros genes candidatos posicionales, distintos a *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN*, que pudieran estar involucrados en el periodo de incubación de estas enfermedades.

A pesar de los inconvenientes mencionados anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

- 1- Por primera vez, los genes ovinos *IL1B* e *IL1RN* han sido parcialmente aislados y caracterizados, incluyendo el promotor y otras regiones reguladoras.
- 2- Ambos genes han sido posicionados en OAR3p22, en una región que había sido previamente descrita como QTL para el periodo de incubación a SC en las especies ovina y murina.
- 3- El estudio de expresión mediante PCR en tiempo real reveló un aumento significativo del RNAm de ambas citoquinas en cerebelo, pero no en bazo.
- 4- El análisis de asociación, mediante un diseño de genotipado selectivo, identificó un SNP, en el gen *IL1B*, asociado a la distinta resistencia/susceptibilidad a la infección por SC en la muestra de animales aquí estudiada y que podría estar en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal.
- 5- El gen *HSP90AA1*, incluyendo el promotor y otras regiones reguladoras, ha sido aislado y caracterizado por primera vez en la especie ovina.

6- Se ha determinado la localización de este gen en una región implicada en el periodo de incubación a SC en modelos murinos y ovinos (OAR19q24dist).

7- El análisis de asociación reveló la existencia de varios polimorfismos en la región 5'flanqueante y en el intrón 10 de este gen, que estaban diferencialmente distribuidos entre los animales que mostraban distinta respuesta a la infección por SC. Así pues, al menos en la muestra de animales aquí estudiada, los alelos GG y ATCTCC, para las posiciones descritas en la región 5'flanqueante y en el intrón 10, presentaron asociación con una mayor susceptibilidad a SC.

8- El gen ovino *RPSA* ha sido parcialmente aislado, caracterizado y posicionado en OAR19q13 por primera vez.

9- Los estudios de expresión mostraron que tanto los niveles de ARNm como de proteína variaban en el cerebro como consecuencia de la infección. Los cambios encontrados podrían estar revelando el consumo del ARNm y de la forma precursora del receptor a favor de la síntesis de LR, para poder reemplazar a la isoforma madura de este receptor, que estaría siendo secuestrada por los priones entrantes.

10- El análisis de asociación detectó asociación con un polimorfismo, que revelaba la presencia/ausencia de un pseudogen, que mostró una mayor frecuencia en el grupo de animales resistentes.

11- Las posiciones 241, 272 y 290 de LRP/LR podrían participar en la barrera de especie del SC y quizás también de otras EETs.

Considerando todo esto y teniendo en cuenta que, en última instancia, las proteínas son las responsables de determinar el fenotipo, sería interesante esclarecer si los polimorfismos encontrados en este trabajo tienen realmente un efecto sobre la concentración final de LRP/LR, Hsp90 α , IL-1 β e IL-1Ra. El posible efecto que éstos pudieran tener, podría ser consecuencia de la alteración de los sitios de unión a factores de transcripción, de *splicing*, y/o de microARNs, que podrían actuar como moduladores transcipcionales, postranscipcionales y traduccionales. Por tanto, este trabajo abre una línea clara de investigación que, utilizando una muestra de animales adecuada (ovejas pertenecientes a un mismo rebaño, con igual genotipo de *PRNP* y que mostrasen distintos periodos de incubación), podría confirmar la asociación entre los polimorfismos aquí identificados con los niveles tanto de RNAm como de proteína. Finalmente,

también sería importante comprobar los efectos derivados de la posible redistribución de estas proteínas, entre los distintos compartimentos celulares, como consecuencia de estos polimorfismos.

Despite traditional disease control measures, losses attributable to infectious diseases continue to affect the livestock industries. The emergence of previously undescribed infectious agents has been a feature of the end of the last century. The outbreak of prion diseases, among which SC is included, is an example of this new class of emerging pathogens.

Intervention in the first steps of the disease, attacking prion entrance to CNS, could be a promising way to eradicate this type of diseases. Taking into account that no drug capable of fighting prion infection has yet been identified, the genetic selection of resistant animals could be an alternative. However, research in prion diseases shows that total resistance to prion infection does not exist. In this way, there are several species which are known to surrender easily to the disease (sheep, goat, etc), while others, considered to be resistant (pig, rabbit, etc), can only be infected by certain prion strains and/or in some special circumstances (intracerebral inoculation, high titers of prions, etc). Thus, two important aspects must be considered in the EETs field:

1- To date, there has not been described any genotype conferring total resistance to any prion infection. It should be referred as genetic variants that are related with longer incubation periods instead. Thus, selecting animals based on their *PRNP* genotype does not make much sense because this procedure decreases genetic variability, of the *PRNP* gene and of all the genetic regions in linkage disequilibrium with this locus, and could be dangerous if selected animals either develop a prion disease that cannot be detected, acting as reservoirs facilitating prion dissemination, or if they are susceptible to new emerging strains.

2- Although, at least for the moment, there is not a direct application in breeding schemes, the research in different animal models is fundamental to better understand the mechanism used by prions to enter and spread throughout the organism in order to develop therapies for EETs, and other neuropathies affecting man.

Concerning the former, prion diseases share several characteristics with other neurodegenerative disorders such as Alzheimer and Parkinson diseases. However, at least in ovine and murine models, EETs not only affect CNS, but also spleen and other lymphoreticular organs where high amounts of PrP^{Sc} can be detected. Quite surprisingly, high prion titers in lymphoid organs are not accompanied by significant histopathological changes (Clarke and Haig 1971). Taking into account that PrP^{Sc} presence is not the cause of the neuronal destruction and that switching off the expression of PrP during the course of a TSE results in a cessation of symptoms and an end to the disease progress (Mallucci *et al.* 2003), the harm that prions cause specifically to neurons can be explained attending to the characteristics of the nervous tissue. Thus, the nervous system, is

rich in both metal ions and unsaturated fats, which are prone to oxidation (Halliwell 1992). The high lipid content of the nervous tissue, coupled with its high metabolic (aerobic) activity, makes it particularly susceptible to damage by oxygen radicals (Dawson and Dawson 1996). It has also to be considered that the great specialization acquired by neuronal cells could have been detrimental for other cellular functions such as the defence against the damage derived from protein aggregates accumulation (oxidative stress, neurotoxic compounds...).

There is increasing evidence that amyloid plaque-associated activated glia and glia-derived cytokines are important pathogenic factors in the development of neuropathological changes and the progression of neurodegenerative disorders including TSEs. Besides, in hamster brains infected with the 263K strain, the presence of oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been suggested as the main mechanism triggering neuronal cell loss in SC (Choi *et al.* 1998). Thus, it is conceivable that the proteins encoded by the four genes studied here have a role in different aspects of prion diseases, including cellular entrance of PrP^{Sc} (*RPSA*), cellular response against abnormal protein accumulation (*HSP90AA1*), as well as the localised inflammatory response which could contribute to exacerbate cellular damage (*HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN*).

Regarding this, LRP/LR could hinder the entrance of some prion strains, as well as play a role in prions propagation and/or in cell death processes. In this way, Morel and co-workers (Morel *et al.* 2005) proposed a potential role of enterocytes in the absorption of bovine prions during oral infection through specific LRP/LR-dependent endocytosis. In addition, treatments using heparan mimetics and pentosan polysulfate, which interfere with heparan sulfate proteoglycans, the proposed cofactors/co-receptors of LRP/LR in PrP^C metabolism and prion propagation (Adjou *et al.* 2003; Gauczynski *et al.* 2001; Horonchik *et al.* 2005; Hundt *et al.* 2001; Leucht *et al.* 2003; Morel *et al.* 2005; Rieger *et al.* 1997; Vana and Weiss 2006), are considered among the more promising drugs used in experimental models of prion diseases. However, LRP/LR is able to mediate internalisation of only 25% to 50% of the membrane-bound recombinant PrP^C (Gauczynski *et al.* 2001b), which is consistent with the participation of other cell surface proteins in this process (Lee *et al.* 2003). Thus, understanding all the mechanisms used by prions to enter in, and propagate through the organism constitutes a key factor for the development of control programs and new therapies. It is crucial to understand that preventing prion entrance is the only way to obtain resistant animals because, although we cannot appreciate its consequences due to the long incubation periods shown by some animals or species, once prions enter and start their replication the disease will progress. On the other hand, inter-individual differences in the

production, accumulation at the cell surface and/or shedding to the extracellular space of LRP/LR, as well as differences at the LRP/LR amino acid sequence affecting the interaction with the PrP^{Sc}, could be responsible for the variable responses to SC infection. In addition, it has been demonstrated that the higher is the LR expression in cell membranes, the more LR is secreted to the medium. Besides, secreted LR retains its ability to bind laminin (Karpatova *et al.* 1996). Considering that PrP and laminin share the binding domain to LRP/LR, those cells secreting more LR to the medium may hinder the infection by sequestering surrounding prions. In addition, bands in molecular weight rates of 60-80 and 116-220 kDa that are probably LRP/LR related has been described by western blotting (Buto *et al.* 1998; Simoneau *et al.* 2003). Thus, it would be interesting to demonstrate a cell-type or a subcellular compartment-specific distribution of particular LR isoforms exhibiting different affinities for PrP^c. In this way, Baloui and co-workers (2004) described that the overall distribution of LR correlated with brain regions classically associated with prion related neurodegeneration, and that LRP expression was restricted to a subset of neurons known to be particularly sensitive to abnormal prion accumulation. Therefore, strict control of LRP/LR localization could be crucial for CNS neurons (Baloui *et al.* 2004).

On the other hand, the cellular response to stress, such that caused by prion accumulation, involves a number of specific signalling events as well as the activation and synthesis of molecular chaperones, which form large complexes and have a large number of co-chaperones to regulate their activity, binding to other proteins and function. Chaperones exert their beneficial effects *via* basically two modes of action depending on their relative location within the host. Intracellular proteins serve a cytoprotective role by chaperoning naïve, misfolded and/or denatured proteins in response to stressful stimuli by a process known as the stress response. However, stressful stimuli also induce the release of chaperones into the extracellular milieu, which play a cyto stimulatory role by initiating immune responses (Asea 2006).

Although the involvement of stress proteins in several steps of prion conversion, propagation and clearance, as well as in neuronal death, seems to be essential, which are those chaperones and the reactions they are involved into remain elusive. Existing evidence indicates that the balance between the components of the chaperone complexes is a key regulator in prion propagation. In this regard, chaperones may both neutralize and activate aggregation processes depending on the exact chaperone-target ratio (Soti and Csermely 2002). Besides, chaperone complexes regulate local protein networks and may be important elements to promote the cross-talk between various signalling processes. They also have an important role in membrane stabilization, cellular redox

status maintenance, DNA integrity protection and transcriptional networks regulation. Thus, when the cell undergoes stress, chaperones become increasingly occupied by damaged proteins. This, together with the stress-induced translocation of chaperones to the nucleus, might lead to an automatic de-coupling of all chaperone-mediated networks which could have different consequences for the cell fate. The hypothesis exposed in IV.3 section, regarding the consequences that the accumulation of proteinaceous aggregates might have in the activation of HSF-1 and in the disfunction of the proteasome as a result of the competition of PrP^{Sc} for the binding to Hsp90, is an example of this. So, the stress response pathways, despite their adaptive and beneficial effects, are accompanied by “collateral damage” which may account for their toxicity, particularly if they are chronically stimulated. Indeed, it is known that some chaperones are able to induce a plethora of immune responses as the release of cytokines including IL-1 β ; nitric oxide and chemokines

For many years, the central nervous system (CNS) was considered to be 'immune privileged', neither susceptible nor contributing to inflammation. It is now appreciated that the CNS does exhibit features of inflammation, and in response to injury, infection or disease, resident CNS cells generate inflammatory mediators, including proinflammatory cytokines, prostaglandins and free radicals, which in turn induce chemokines and adhesion molecules, recruit immune cells, and activate glial cells (Lucas *et al.* 2006). Glial functions are controlled by communication with cytokines, chemokines, trophic factors, and other neuro-modulatory molecules among neurons, astrocytes, and microglia. Cytokines are polypeptide soluble factors that control the growth and differentiation of cells involved in the immune and haematopoietic systems. They show pleiotropic, complementary and counteractive biological actions; each of them exerts multiple effects on different cells, and different factors can act on the same cell populations to induce similar or opposite effects (Sawada *et al.* 1995). Thus, cytokine signal propagation spreads along neuronal projections and extracellular diffusion pathways and is subsumed by molecular cascades which were proposed to form autocrine-paracrine-juxtacrine feedback systems within the brain (Vitkovic *et al.* 2000). In addition, these cascades include several potentially neurotoxic steps, including raised intraneuronal free calcium concentrations, overstimulation and increased tissue levels of nitric oxide and free radicals, which lead to oxidative damage. IL-1 β and IL-1Ra are members of the IL-1 family, which participates in several molecular networks.

In general, the complex interplay between chaperones, inflammatory mediators, genetic background, and environmental factors may ultimately regulate the outcome of acute CNS injury and progression of chronic neurodegeneration, such that taking place during prion diseases. The

propagation of cytokine and chaperone signals through the brain is important because imbalanced microglial activation or hyperactivation of microglia due to failures in these networks may cause or promote neurodegeneration. In this regard, the scientific community is starting to have an initial idea on stress-induced network rearrangements as well as on a few mechanisms helping the cell to preserve robustness under these conditions (Szalay *et al.* 2007). Understanding these interactions in greater detail will hopefully lead to the development of effective therapies and breeding schemes for man and livestock welfare, respectively.

In the present work, the possible contribution of *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* and *IL1RN* genes to the polygenic variance associated with the different resistance/susceptibility to SC infection in sheep has been studied. With reference to this study, it is crucial to bear in mind that despite the 84 sheep genotyped in the association analysis belonged to the same breed (Rasa Aragonesa) and *PRNP* genotype, they pertained to seven flocks of sheep where natural SC was detected. Thirty-three of them (infected), which were selected from six different flocks, exhibited clinical and immunohistochemical signs of SC, while the remaining 51 (healthy), despite pertaining to a flock where SC was detected, did not. No PrP^{sc} or clinical signs were detected in these 51 animals, nevertheless, the possible appearance of infection signs with longer incubation periods cannot be ruled out. Thus, we have to be cautious when considering those animals designed as “healthy” in the present study because two things may be happening: 1) these animals are not “resistant”, but tolerant. So, they will develop the disease more slowly than their “sensible” partners, and/or 2) in spite of pertaining to SC outbreaks; they were never in contact with prions. In addition, we did not have any information about the incubation period of these animals. So, the existence of polymorphisms related with prion incubation period which were not detected in the association analysis because of the inadequate animal sample used should be considered. Moreover, the expression analysis was performed only in spleen and cerebellum, and the existence of other tissues or brain regions where these genes have a different behaviour should be assessed. Finally, the possible involvement of other possible candidate genes, different from those studied here, in the polygenic response to SC infection cannot be discarded.

Despite all the inconveniences mentioned above, the conclusions of the present work are the following ones:

- 1- Both, *IL1B* and *IL1RN* genes were partially isolated and characterized for the first time in the ovine specie, including promoter and other regulatory regions.

- 2- Their cytogenetic position in OAR3p22, a region previously described as carrying a QTL for SC incubation period in sheep and mice, was determined.
- 3- Real time RT-PCR revealed a significant increase in mRNA of both cytokines as a consequence of SC infection in cerebellum, but not in spleen.
- 4- The association analysis revealed a SNP, which could be in linkage disequilibrium with the causal mutation in *IL1B* gene, which was associated to the different resistance/susceptibility to SC infection in the animal sample studied here.
- 5- The ovine *HSP90AA1* gene including the promoter and other regulatory regions has been isolated and characterized for the first time.
- 6- The localization of the ovine *HSP90AA1* gene on OAR19q24dist was established. This chromosome region has been shown to include a QTL for SC incubation period in both ovine and murine models.
- 7- Association analyses revealed that several polymorphisms in *HSP90AA1* gene were differentially distributed among animals with different responses to SC infection. Thus, at least in the sheep sample analysed here, the GG and the ATCTCC alleles, for positions described at 5' flanking region and intron 10 are associated with higher susceptibility to SC.
- 8- For the first time, the entire sequence of the ovine laminin receptor gene (*RPSA*) was isolated (with the exception of intron 3), characterized and mapped to ovine chromosome OAR19q13.
- 9- Expression results revealed changes at both mRNA and protein level, in the brain of SC infected sheep, which could be showing the consumption of *RPSA* mRNA and the LRP isoform in order to replace the LR which is being retained by entering prions.
- 10 Association analysis showed that a polymorphism, reflecting the presence of a *RPSA* pseudogene, was over-represented in a group of sheep resistant to scrapie infection.
- 11- Amino acid positions 241, 272 and 290 could participate in the species barrier to SC and maybe to other TSEs.

Therefore, considering all this and taking into account that, as in the last resort, proteins are responsible for determining the phenotype, it would be interesting to establish if the

polymorphisms found in the present work have a real effect on the final concentration of the LRP/LR, Hsp90- α , IL-1 β , and IL-1Ra. This possible effect could be the consequence of altered binding sites for transcription factors, splicing factors and/or microRNAs which act as transcriptional, post-transcriptional and translational modulators. So, this study opens a research field in which, using an adequate animal sample (sheep from the same flock and *PRNP* genotype and showing different incubation periods), the association between the polymorphisms found here with both mRNA and protein levels could be tested. Checking possible effects due to the altered distribution of these proteins within the different cellular compartments as a possible consequence of the polymorphisms found might be also important.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adjou KT, Simoneau S, Sales N, Lamoury F, Dormont D, Papy-Garcia D, Barritault D, Deslys J-P, Lasmezas CI (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. 10.1099/vir.0.19073-0. *J Gen Virol* 84, 2595-2603
- Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116, 313-327
- Allen KD, Wegrzyn RD, Chernova TA, Muller S, Newnam GP, Winslett PA, Wittich KB, Wilkinson KD, Chernoff YO (2005) Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI⁺]. *Genetics* 169, 1227-1242
- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F (2000) Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81, 3115-3126
- Ardini E, Pesole G, Tagliabue E, Magnifico A, Castronovo V, Sobel ME, Colnaghi MI, Menard S (1998) The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. *Mol Biol Evol* 15, 1017-1025
- Asano Y, Takashima S, Asakura M, Shintani Y, Liao Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogai A, Fukushima T, Oikawa Y, Okazaki Y, Kaneda Y, Sato M, Miyazaki J, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M, Hori M (2004) Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-130
- Asea A (2006) Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev* 2, 209-215
- Auth D, Brawerman G (1992) A 33-kDa Polypeptide with Homology to the Laminin Receptor: Component of Translation Machinery. *PNAS* 89, 4368-4372
- Baker CA, Manuelidis L (2003) Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *PNAS* 100, 675-679
- Balakirev ES, Ayala FJ (2003) Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu Rev Genet* 37, 123-151
- Baloui H, von Boxberg Y, Vinh J, Weiss S, Rossier J, Nothias F, Stettler O (2004) Cellular prion protein/laminin receptor: distribution in adult central nervous system and characterization of an isoform associated with a subtype of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 20, 2605-2616
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428
- Beekes M, McBride PA (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278, 181-184

- Berke SJ, Paulson HL (2003) Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPer hand on neurodegeneration. *Curr Opin Genet Dev* 13, 253-261
- Bessen RA, Marsh RF (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859-7868
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267, 16188-16199
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl, S2-9
- Bouzamondo E, Milroy AM, Ralston HJ, 3rd, Prusiner SB, DeArmond SJ (2000) Selective neuronal vulnerability during experimental scrapie infection: insights from an ultrastructural investigation. *Brain Res* 874, 210-215
- Brown AR, Webb J, Rebus S, Walker R, Williams A, Fazakerley JK (2003) Inducible cytokine gene expression in the brain in the ME7/CV mouse model of scrapie is highly restricted, is at a strikingly low level relative to the degree of gliosis and occurs only late in disease. *J Gen Virol* 84, 2605-2611
- Brown DR (2001) Copper and prion disease. *Brain Res Bull* 55, 165-173
- Brown DR (2005) Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathol* 43, 229-243
- Brown DR, Clive C, Haswell SJ (2001) Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* 76, 69-76
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347
- Buto S, Tagliabue E, Ardini E, Magnifico A, Ghirelli C, van den Brule F, Castronovo V, Colnaghi MI, Sobel ME, Menard S (1998) Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem* 69, 244-251
- Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* 15, 102-111
- Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV (1994) Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 68, 2383-2387
- Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, Westaway D, Prusiner SB (1988) Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol* 8, 5528-5540

- Castilla J, Gutierrez-Adan A, Brun A, Doyle D, Pintado B, Ramirez MA, Salguero FJ, Parra B, Segundo FDS, Sanchez-Vizcaino JM, Rogers M, Torres JM (2004) Subclinical Bovine Spongiform Encephalopathy Infection in Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein. *J. Neurosci.* 24, 5063-5069
- Caughey B (2001) Prion protein interconversions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 197-200; discussion 200-192
- Caughey B, Raymond G (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 18217-18223
- Clarke MC, Haig DA (1971) Multiplication of scrapie agent in mouse spleen. *Research in veterinary science* 12, 195-197
- Clausse N, Jackers P, Jares P, Joris B, Sobel ME, Castronovo V (1996) Identification of the active gene coding for the metastasis-associated 37LRP/p40 multifunctional protein. *DNA Cell Biol* 15, 1009-1023
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690
- Cunningham C, Wilcockson DC, Boche D, Perry VH (2005) Comparison of Inflammatory and Acute-Phase Responses in the Brain and Peripheral Organs of the ME7 Model of Prion Disease. *J. Virol.* 79, 5174-5184
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86, 627-637
- Chesebro B (1999) Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Neuron* 24, 503-506
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J* 21, 3317-3326
- Choi SI, Ju WK, Choi EK, Kim J, Lea HZ, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS (1998) Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. *Acta Neuropathol (Berl)* 96, 279-286
- Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys J-P, Lasmezas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M (1998) Gene Expression in Scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mrna transcripts. *J. Biol. Chem.* 273, 7691-7697
- Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N (1998) Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec* 142, 623-625
- Dawson VL, Dawson TM (1996) Free radicals and neuronal cell death. *Cell death and differentiation* 3, 71-78

- DeArmond SJ, Prusiner SB (1995) Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* 146, 785-811
- DeArmond SJ, Yang SL, Lee A, Bowler R, Taraboulos A, Groth D, Prusiner SB (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6449-6453
- Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425, 717-720
- Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM (2005) Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol* 86, 849-857
- Dickinson AG (1975) Host-pathogen interactions in scrapie. *Genetics* 79 Suppl, 387-395
- Dickinson AG (1976) Scrapie in sheep and goats. *Frontiers of biology* 44, 209-241
- Dickinson AG, Outram GW (1988) Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* 135, 63-83
- Diedrich JF, Carp RI, Haase AT (1993) Increased expression of heat shock protein, transferrin, and beta 2-microglobulin in astrocytes during scrapie. *Microb Pathog* 15, 1-6
- Dimcheff DE, Portis JL, Caughey B (2003) Prion proteins meet protein quality control. *Trends Cell Biol* 13, 337-340
- Duguid JR, Bohmont CW, Liu NG, Tourtellotte WW (1989) Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7260-7264
- Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE (2006) Heat Shock Proteins 70 and 90 Inhibit Early Stages of Amyloid beta-(1-42) Aggregation in Vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 33182-33191
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* 15, 1255-1264
- Fraser H, Dickinson AG (1968) The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78, 301-311
- Gajdusek DC (1994) Spontaneous generation of infectious nucleating amyloids in the transmissible and nontransmissible cerebral amyloidoses. *Mol Neurobiol* 8, 1-13
- Garcia-Crespo D, Juste R, Hurtado A (2005) Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research* 1, 3
- Gauczynski S, Hundt C, Leucht C, Weiss S (2001a) Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv Protein Chem* 57, 229-272

- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001b) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 20, 5863-5875
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8, 449-457
- Giese A, Kretzschmar HA (2001) Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* 253, 203-217
- Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brustle O (2007) Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS ONE* 2, e298
- Glatzel M, Aguzzi A (2001) Sympathetic prions. *ScientificWorldJournal* 1, 555-556
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82, 373-428
- Goldmann W, Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Hunter N (2005) Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1294-1302
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 85-92
- Green P, Falls K, Crooks S (1990) CriMap, Version 2.4. . Washington University School of Medicine, St
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 1609-1623
- Harris DA (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP: Protein function in prion disease. *Br Med Bull* 66, 71-85
- Hayes H, Petit E, Dutrillaux B (1991) Comparison of RBG-banded karyotypes of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet* 57, 51-55
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species
- 10.1073/pnas.97.18.10248. *PNAS* 97, 10248-10253
- Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K-i, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423, 91-96
- Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, *et al.* (1993) Characterization of a functional NF-kappa B site in the human

- interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13, 6231-6240
- Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodavsky I, Taraboulos A (2005) Heparan Sulfate Is a Cellular Receptor for Purified Infectious Prions. *J. Biol. Chem.* 280, 17062-17067
- Huelamo T, Gonzalo I, Parra B, Nevado J, Anadon E, Gómez-Tejedor C, Mayoral T (2007) Atypical Scrapie Field Cases Characterization in Spanish Ovine Breeds. *Prion* 2007, 43
- Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J* 20, 5876-5886
- Hunninghake GW, Monks BG, Geist LJ, Monick MM, Monroy MA, Stinski MF, Webb AC, Dayer JM, Auron PE, Fenton MJ (1992) The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol Cell Biol* 12, 3439-3448
- Hunter N (1997) PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends in microbiology* 5, 331-334
- Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K (2003) The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *Embo J* 22, 3557-3567
- Jackers P, Clausse N, Fernandez M, Berti A, Princen F, Wewer U, Sobel ME, Castronovo V (1996) Seventeen copies of the human 37 kDa laminin receptor precursor/p40 ribosome-associated protein gene are processed pseudogenes arisen from retropositional events. *Biochim Biophys Acta* 1305, 98-104
- Jacquier-Sarlin MR, Jornot L, Polla BS (1995) Differential Expression and Regulation of hsp70 and hsp90 by Phorbol Esters and Heat Shock. *J. Biol. Chem.* 270, 14094-14099
- Kakimura J-I, Kitamura Y, Takata K, Umeki M, Suzuki S, Shibagaki K, Taniguchi T, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Smith MA, Perry G, Shimohama S (2002) Microglial activation and amyloid- β clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J.* 16, 601-603
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M (2000) Interleukin (IL)1 β , IL-1 α , and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 47, 571-574
- Kang SC, Brown DR, Whiteman M, Li R, Pan T, Perry G, Wisniewski T, Sy MS, Wong BS (2004) Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. *J Pathol* 203, 603-608
- Karpatova M, Tagliabue E, Castronovo V, Magnifico A, Ardini E, Morelli D, Belotti D, Colnaghi MI, Menard S (1996) Shedding of the 67-kD laminin receptor by human cancer cells. *J Cell Biochem* 60, 226-234
- Kimberlin RH, Walker CA (1980) Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol* 51, 183-187

- Kinoshita K, Kaneda Y, Sato M, Saeki Y, Wataya-Kaneda M, Hoffmann A (1998) LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 277-282
- Kiss AM, Jady BE, Bertrand E, Kiss T (2004) Human Box H/ACA Pseudouridylation Guide RNA Machinery. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5797-5807
- Knorr C, Beuermann C, Beck J, Brenig B (2007) Characterization of the porcine multicopy ribosomal protein SA/37-kDa laminin receptor gene family. *Gene* 395, 135-143
- Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Jr., Caughey B (1995) Species Specificity in the Cell-Free Conversion of Prion Protein to Protease-Resistant Forms: A Model for the Scrapie Species Barrier. *PNAS* 92, 3923-3927
- Kominato Y, Galson D, Waterman W, Webb A, Auron P (1995) Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 59-68
- Kordek R (2000) The diagnosis of human prion diseases. *Folia Neuropathol* 38, 151-160
- Landowski TH, Dratz EA, Starkey JR (1995) Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry* 34, 11276-11287
- Langer P, Waldrop A, Ward D (1981) Enzymatic Detection of Biotin Labeled Polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637
- Lasmezas CI (2003) The transmissible spongiform encephalopathies. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 22, 23-36
- Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte J-L, Sarradin P, Benestad SL, Laude H (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 16031-16036
- Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR (2003) Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol* 13, 399-408
- Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S (2003) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4, 290-295
- Licastro F, Veglia F, Chiappelli M, Grimaldi LM, Masliah E (2004) A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25, 1017-1022
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S232-240

- Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *PNAS* 102, 640-645
- Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, Targonski P, Collinge J, Fisher EM (2001) Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6279-6283
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and Neurodegeneration When PrP Accumulates in the Cytosol. *Science* 298, 1781-1785
- Mabbott NA, Bruce ME (2001) The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* 82, 2307-2318
- Malolepsza E, Boniecki M, Kolinski A, Piela L (2005) Theoretical model of prion propagation: a misfolded protein induces misfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7835-7840
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302, 871-874
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J* 21, 202-210
- Manolakou K, Beaton J, McConnell I, Farquar C, Manson J, Hastie ND, Bruce M, Jackson JJ (2001) Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *PNAS* 98, 7402-7407
- Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Serrano C, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Alves E, Zaragoza P, Badiola JJ, Serrano M (2007a) IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression. *Mamm Genome* 18, 53-63
- Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Serrano C, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Serrano M (2007b) Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie. *Cell Stress Chaperones* In press
- Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Serrano C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Torres JM, Serrano M (accepted) Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (RPSA). Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response
- Mariottini P, Amaldi F (1990) The 5' untranslated region of mRNA for ribosomal protein S19 is involved in its translational regulation during *Xenopus* development. *Mol. Cell. Biol.* 10, 816-822
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG (2002) Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 326, 67-69

- McGovern G, Brown KL, Bruce ME, Jeffrey M (2004) Murine scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen. *J Comp Pathol* 130, 181-194
- Merrill JD, Sigaroudinia M, Kohl S (1996) Characterization of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity of preterm infants against human immunodeficiency virus-infected cells. *Pediatric research* 40, 498-503
- Migliore L, Coppede F (2002) Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation research* 512, 135-153
- Miller S, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180, 147-150
- Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B, *et al.* (1994) Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2839-2842
- Monleón E, Cristina Acín, Monzón M, Bolea R (2006) Evolución de la EEB y del Scrapie en España. Revisión de los aspectos más importantes de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y de la situación actual en España de los programas de control. *Mundo Veterinario*. 187
- Morel E, Andrieu T, Casagrande F, Gauczynski S, Weiss S, Grassi J, Rousset M, Dormont D, Chambaz J (2005) Bovine Prion Is Endocytosed by Human Enterocytes via the 37 kDa/67 kDa Laminin Receptor. *Am J Pathol* 167, 1033-1042
- Moreno CR, Cosseddu GM, Andreoletti IO, Schibler L, Roig A, Moazami-Goudarzi IK, EYyehenne F, Lajous D, Schelcher F, Crihiu EP, Vaiman D, Elsen JM (2003a) Identification of quantitative trait loci (QTL) modulating prion incubation period in sheep. (Identification de QTL affectant la durée d'incubation de la tremblante chez les ovins.). (Toulouse: Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat)
- Moreno CR, Lantier F, Lantier I, Sarradin P, Elsen JM (2003b) Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165, 2085-2091
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289, 1925-1928
- Murdoch B, McKay S, Prasad A, Marques E, Kolbehdari D, Wang Z, Stella A, Clawson M, Heaton MP, Laegreid WW, Moore S, Williams JL (2007) Genome Scan for BSE Susceptibility and/or Resistance in European Holstein Cattle. *Prion2007*
- Nadeau JH, Sankoff D (1998) Counting on comparative maps. *Trends Genet* 14, 495-501

- Nag MK, Thai TT, Ruff EA, Selvamurugan N, Kunnimalaiyaan M, Eliceiri GL (1993) Genes for E1, E2, and E3 Small Nucleolar RNAs. PNAS 90, 9001-9005
- Nemetz A, Nosti-Escanilla MP, Molnar T, Kope A, Kovacs A, Feher J, Tulassay Z, Nagy F, Garcia-Gonzalez MA, Pena AS (1999) IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. Immunogenetics 49, 527-531
- Nesic D, Maquat LE (1994) Upstream introns influence the efficiency of final intron removal and RNA 3'-end formation. Genes Dev 8, 363-375
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, *et al.* (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell 40, 735-746
- Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ (2005) The prion gene is associated with human long-term memory. Human molecular genetics 14, 2241-2246
- Pattison IH, Jones KM (1968) Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. Research in veterinary science 9, 408-410
- Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. J Biol Chem 273, 33107-33110
- Peretz D, Scott MR, Groth D, Williamson RA, Burton DR, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. Protein Sci 10, 854-863
- Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. J Cell Biol 162, 703-717
- Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. J Neurochem 88, 769-781
- Priola SA, Caughey B, Race RE, Chesebro B (1994) Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells. J. Virol. 68, 4873-4878
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216, 136-144
- Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. Science 252, 1515-1522
- Prusiner SB (1998) Prions. PNAS 95, 13363-13383
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, *et al.* (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. Cell 63, 673-686

- Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Hong YS, Kim DW, Kim CC, Kim HK, Kim TG (2003) Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population. *Hum Immunol* 64, 979-989
- Rabacchi SA, Neve RL, Drager UC (1990) A positional marker for the dorsal embryonic retina is homologous to the high-affinity laminin receptor. *Development* 109, 521-531
- Race R, Oldstone M, Chesebro B (2000) Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* 74, 828-833
- Rezaie P, Lantos PL (2001) Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* 35, 55-72
- Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 3, 1383-1388
- Riemer C, Queck I, Simon D, Kurth R, Baier M (2000) Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J Virol* 74, 10245-10248
- Rocchi A, Micheli D, Ceravolo R, Manca ML, Tognoni G, Siciliano G, Murri L (2003) Serotonergic polymorphisms (5-HTTLPR and 5-HT2A): association studies with psychosis in Alzheimer disease. *Genetic testing* 7, 309-314
- Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in neurosciences* 23, 618-625
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4, 1157-1165
- Santtila S, Savinainen K, Hurme M (1998) Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 47, 195-198
- SAS RSII, Cary, NC. (1998)
- Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T (1995) Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci* 13, 253-264
- Sciacca FL, Ferri C, Licastro F, Veglia F, Biunno I, Gavazzi A, Calabrese E, Martinelli Boneschi F, Sorbi S, Mariani C, Franceschi M, Grimaldi LM (2003) Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 927-931
- Selvamurugan N, Eliceiri GL (1995) The gene for human E2 small nucleolar RNA resides in an intron of a laminin-binding protein gene. *Genomics* 30, 400-401
- Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17, 761-766

- Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, Webb AC, Auron PE (1993) The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol* 13, 1332-1344
- Shmakov AN, Bode J, Kilshaw PJ, Ghosh S (2000) Diverse patterns of expression of the 67-kD laminin receptor in human small intestinal mucosa: potential binding sites for prion proteins? *J Pathol* 191, 318-322
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 268, 15922-15928
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* 437, 257-261
- Simoneau S, Haik S, Leucht C, Dormont D, Deslys JP, Weiss S, Lasmezas C (2003) Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP. *Biol Chem* 384, 243-246
- Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303, 1514-1516
- Soti C, Csermely P (2002) Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int* 41, 383-389
- Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P (2005) Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 146, 769-780
- Stefani M, Dobson CM (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 81, 678-699
- Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA (2000) Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* 69, 47-53
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* 22, 3591-3601
- Szalay MS, Kovacs IA, Korcsmaros T, Bode C, Csermely P (2007) Stress-induced rearrangements of cellular networks: Consequences for protection and drug design. *FEBS Lett* 581, 3675-3680
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996) Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity. *Science* 274, 2079-2082
- Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AC, Auron PE (1994) Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol* 14, 7285-7297

- Vaiman D, Billault A, Tabet-Aoul K, Schibler L, Vilette D, Oustry-Vaiman A, Soravito C, Crihiu EP (1999) Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mamm Genome* 10, 585-587
- Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S (2002) Genetic control of IL-1 β bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist. *Eur J Immunol* 32, 2988-2996
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA (1999) Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* 121, 55-63
- van Keulen LJ, Vromans ME, van Zijderveld FG (2002) Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis* 110, 23-32
- Vana K, Weiss S (2006) A trans-dominant negative 37kDa/67kDa laminin receptor mutant impairs PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *J Mol Biol* 358, 57-66
- Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C (2000) Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 5, 604-615
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and peptide letters* 11, 213-228
- Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T (2005) Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med* 33, 89-97; discussion 242-243
- Watt NT, Hooper NM (2003) The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* 28, 406-410
- Wayne ML, McIntyre LM (2002) Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14903-14906
- Weissmann C (1991) A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* 352, 679-683
- Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651-662
- Willemarck N, Van Poucke M, Van Steen K, Sofie M, Van Zeveren A, Peelman L (2007) PRNP polymorphisms associated with PRNP mRNA expression in blood in belgian sheep population. *Prion* 2007, 101
- Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H (1997) Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res* 754, 171-180
- Xiang W, Windl O, Wunsch G, Dugas M, Kohlmann A, Dierkes N, Westner IM, Kretzschmar HA (2004) Identification of Differentially Expressed Genes in Scrapie-Infected Mouse Brains by Using Global Gene Expression Technology. *J. Virol.* 78, 11051-11060

- Ye X, Scallet AC, Kascsak RJ, Carp RI (1998) Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res* 809, 277-287
- Yehiely F, Bamborough P, Da Costa M, Perry BJ, Thinakaran G, Cohen FE, Carlson GA, Prusiner SB (1997) Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis* 3, 339-355
- Yenofsky R, Bergmann I, Brawerman G (1982) Messenger RNA Species Partially in a Repressed State in Mouse Sarcoma Ascites Cells. *PNAS* 79, 5876-5880
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G (1983) Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1197-1203
- Zeiler B, Adler V, Kryukov V, Grossman A (2003) Concentration and removal of prion proteins from biological solutions. *Biotechnol Appl Biochem* 37, 173-182
- Zemann A, op de Bekke A, Kiefmann M, Brosius J, Schmitz J (2006) Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. 10.1093/nar/gkl359. *Nucl. Acids Res.* 34, 2676-2685
- Zhang SL, Yu J, Cheng XK, Ding L, Heng FY, Wu NH, Shen YF (1999) Regulation of human hsp90alpha gene expression. *FEBS Lett* 444, 130-135
- Zhao J, Hyman L, Moore C (1999) Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 405-445
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480

VIII. ANEXOS

VIII.1 SECUENCIAS AISLADAS


```

LOCUS      EF394773                4721 bp    DNA        linear    MAM 24-APR-2007
DEFINITION Ovis aries laminin receptor precursor (LamR1) gene, exons 1 through
7 and partial cds.
ACCESSION  EF394773
VERSION    EF394773
KEYWORDS    .
SOURCE      Ovis aries (sheep)
  ORGANISM  Ovis aries
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
            Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
REFERENCE  1 (bases 1 to 4721)
  AUTHORS  Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
            Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
            Lyahyai,J., Martin-Burriel,I. and Serrano,M.
  TITLE    LamR1 as a candidate gene modulating scrapie susceptibility in
            sheep
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 4721)
  AUTHORS  Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Alves,E. and
            Serrano,M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-JAN-2007) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La
            Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
FEATURES   Location/Qualifiers
     source          1..4721
                     /organism="Ovis aries"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9940"
     gene            358..4721
                     /gene="LamR1"
     mRNA            join(358..402,1801..1966,3003..>3047)
                     /gene="LamR1"
                     /product="laminin receptor precursor"
     exon            358..402
                     /gene="LamR1"
                     /number=1
     intron           403..1800
                     /gene="LamR1"
                     /number=1
     variation        540
                     /gene="LamR1"
                     /replace="a"
     variation        1106
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     variation        1318
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     variation        1321
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     variation        1388
                     /gene="LamR1"
                     /replace="g"
     variation        1676
                     /gene="LamR1"
                     /replace="g"
     variation        1722
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     variation        1730
                     /gene="LamR1"
                     /replace="g"
     variation        1767
                     /gene="LamR1"
                     /replace="a"
     variation        1798
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     exon            1801..1966
                     /gene="LamR1"
                     /number=2
     variation        1809
                     /gene="LamR1"
                     /replace="t"
     CDS             join(1834..1966,3003..>3047)
                     /gene="LamR1"
                     /note="ribosomal protein SA; coding region disrupted by
                     sequencing gap"
                     /codon_start=1
                     /product="laminin receptor precursor"
                     /protein_id="ABP93947"
                     /translation="MSGALDVLQMKEEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSD
                     GIYIINLKRTWEKLL"
     intron           1967..3002
                     /gene="LamR1"
                     /number=2
     variation        2155
                     /gene="LamR1"

```

```

variation      /replace="t"
2483
/ gene="LamR1"
misc_feature    /replace="t"
2784..2930
/ gene="LamR1"
/ note="similar to Homo sapiens snoRNA ACA6 in GenBank
accession number AJ609429"
exon            3003..>3047
/ gene="LamR1"
/ number=3
gap            3048..3147
/ note="corresonds to last part of exon 3, all of intron 3
and the first part of exon 4; the complete sequence of
exons 3 and 4 of the ovine LamR1 can be found in GenBank
accession number EF222474"
/ estimated_length=unknown
mRNA           join(<3148..3286,4011..4139,4262..4427,4579..>4721)
/ gene="LamR1"
/ product="laminin receptor precursor"
CDS            join(<3148..3286,4011..4139,4262..4427,4579..4673)
/ gene="LamR1"
/ note="ribosomal protein SA; coding region disrupted by
sequencing gap"
/ codon_start=2
/ product="laminin receptor precursor"
/ protein_id="ABP93948"

/translation="LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAREVLRMRGTISREHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAA
AEKAVTKKEEFQGEWTAPAEFTAAQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQSTEDWSAAP
TAQATEWVGTTTEWS"
exon            <3148..3286
/ gene="LamR1"
/ number=4
intron          3287..4010
/ gene="LamR1"
/ number=4
variation       3313
/ gene="LamR1"
/ replace="c"
misc_feature     3348..3495
/ gene="LamR1"
/ note="similar to Homo sapiens snoRNA E2 in GenBank
accession number U43901"
variation       3714..3715
/ gene="LamR1"
/ replace=" "
variation       3730
/ gene="LamR1"
/ replace="t"
variation       3767
/ gene="LamR1"
/ replace="g"
exon            4011..4139
/ gene="LamR1"
/ number=5
intron          4140..4261
/ gene="LamR1"
/ number=5
variation       4149
/ gene="LamR1"
/ replace="a"
exon            4262..4427
/ gene="LamR1"
/ number=6
variation       4289
/ gene="LamR1"
/ replace="t"
variation       4321
/ gene="LamR1"
/ replace="t"
variation       4330
/ gene="LamR1"
/ replace="c"
variation       4357
/ gene="LamR1"
/ replace="t"
variation       4426
/ gene="LamR1"
/ replace="c"
intron          4428..4578
/ gene="LamR1"
/ number=6
variation       4436
/ gene="LamR1"
/ replace="g"
exon            4579..>4721
/ gene="LamR1"
/ number=7
variation       4674

```



```

/gene="LamR1"
/replace="a"

ORIGIN
1  cagtttttgt  tcatccaaca  gaggtttgtt  cagtgccttc  ccacgaaaga  aaaatgcagt
61  ttaaatgaag  aaccgcctca  agcgcattgg  tacagaaaag  tgggtgagag  caccaatccc
121 agagggcaga  gcgccaatcc  cttgcgggcc  tttccggacc  gcaacgctct  tcgaaacctc
181 agtgcgcaa  tcaacctcc  aacttcggcc  attcgctagg  gtccgcgcta  gccccgtagt
241 ccgtctccg  gaggaaggcc  cgcgccagg  atgcacgcct  tcatcgctct  tccgtgagc
301 tttcgttgtt  attggctgga  tgcggactat  ataaggacgt  catttccgcc  cgcccgctct
361 ttcggcgcta  ccagagagg  ggtccatacg  gcgttgctct  gagtgcgttg  cttttggggt
421 actagtggct  ccagggtca  agaggacaag  cttcctgttc  aaacgagggt  tggggaggac
481 ctgggggtga  agtttgaga  ccgagtgcac  tagtctctga  taggcgctct  accgccagg
541 ctggcgccct  acacgtgacc  gggcccgggc  cgggacgttc  ccactaggcc  tcgggagcgg
601 gcagagggtt  gcctccgcc  cgggaggccc  cgggcccggg  tgcgggtgcc  cggggctgca
661 gagagaacac  cctacgtgac  gcgctagttt  tgactcaaat  ccgcacgctc  ggttgttgaa
721 tcccgagggt  tatgtccag  tttctccat  ctacttgagt  tggctctctc  ctgggtcggt
781 gtgttaaggt  tcttgacgag  gtttttatta  ccggaaagat  caaacttoac  gtttctctc
841 tctcagttca  aaataacttg  gacaaggaa  gtaaaaaaat  gtcataacag  gctaagggtg
901 agagagaaag  aaatttggt  acgaacagac  gcgaaagtgc  actcggggaa  gaaggcaggt
961 gagagagcga  ccagagcct  ttcagacaca  cagcacacac  ccatttcact  ttggtttctc
1021 cagtgggtgg  tttctatggg  aggtttcttg  agtagggggc  aagtacactt  tgttgacatt
1081 ggatggggtc  ttgattgcac  ctggctcctg  aaggcaccgc  acatgctaag  agccattttc
1141 ccgaagaggt  gccttccca  gaggttgaaa  agcagtcacc  tgcagctagt  atgctcctcc
1201 aggcctctgt  gatttggtgg  caggggatcc  tattcagggt  tgaggagcct  taatcaaat
1261 ctatgtaaac  gccatacttg  acacttcctg  gtcacattaa  gtgcagaaaa  aagggggggg
1321 gaggttgctg  attatctgag  tttgagatta  tccttgatct  ggccttggtt  ttctcatttt
1381 aaggaaaact  attaatttta  gaaggatgc  tgaaggatcc  acctcaatc  tgcctgaaaa
1441 taggcctatt  tacatccag  ttggtcact  cctgaatatt  ctacagacat  gctgctggtt
1501 cacatctaac  tctctgtgac  ccttgagtat  taaaaagtct  cactgttttc  catttagtta
1561 cctgggtttt  ttgtctgtct  gcacaccact  ctttcagcag  gatttgattt  tccaagggtg
1621 tgcatagggt  tgtaattgtt  ctgtcctatc  cactagactg  accccgctgc  ctgacactgt
1681 aagaggtgtg  gtctgtggtt  gagattttaa  catcaagtca  cctgactcca  aagagtagaa
1741 tgtaccatcc  cgtttgagtc  cctggagttt  aaaggacttt  ggataactat  tgtttttcag
1801 attcccatct  taacttaaag  ggaagctttc  acaatgtccg  gagcccttga  tgtcctgcaa
1861 atgaaggagg  aggtgtcct  caaattcctt  gcagcaggaa  ccacttagg  tggcaccaac
1921 cttgacttcc  aaatggaaca  gtacatctac  aaaaggaaaa  gtgatggtca  gtcattgctt
1981 tagtgctctt  tgcttggtca  ttccagctat  aagaacaagt  ttgacacta  ctattctggt
2041 actgagttaa  agtgctttgt  gaaatgtgag  ccttagaggg  ctctcactaa  gtaactgagg
2101 aaagtgtgat  tttagattgg  taagaagctt  taaaagtatt  aagtgtctgt  gttgctttta
2161 aaggaacaat  cttgactcc  agtggaagag  tagaaactgg  taggttatgt  gtcgtgggtt
2221 gggccttgaa  taagcacaat  gtaagataaa  ggagaaagtt  taatagcttg  aagtgaagtc
2281 gtcagtcct  tccgactct  ctgcaacccc  atggactgta  gccatcata  ctctccatc
2341 catgggagtt  tccaggcaag  agtactggag  tgggttacca  ttttctctc  cagaagatct
2401 tcccaaccca  gggactgaac  ctgggtctcc  cgcattgcag  gcggatgctt  taccacagcc
2461 tagtttctaa  ttctttatct  ccagagtgct  cttataattt  gtactacca  ataccgggtt
2521 gtaagctgta  ttctgaatt  ggaacaagc  attttggtt  tcaattatgt  atcaggaaaa
2581 gtaaggtagc  ttttgatgag  actggaatgc  attaatgtgt  tcagctgaga  tagaagcacg
2641 gaaggattta  cacctgttga  gtggcgaggt  ttaaggaggt  tcgaggtaaa  taatggtagg
2701 ccgcaataaa  gagcttctgt  gattctgcat  ggaaggcttg  agagtggtta  acacaggagg
2761 ataggaaatg  aaaagatgca  ttttgacat  tattaaagct  cagagtggag  gccagctctg
2821 gccaatgaac  tgcgtaggtg  cggaagtgtg  ctatattaat  ggcaggattt  tcgctaacac
2881 cagttagact  tgctctatg  actggagttt  gatagtactc  gctgccacat  gacttcatgt
2941 ttttagaaga  atattacctt  ataaagctgg  gttcgtctct  aagaaaaact  tgtgtccctt
3001 aggcctctac  atcataaac  tgaagaggac  ctgggagaag  ctgctgttnn  nnnnnnnnnn
3061 nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn
3121 nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnct  tctggtggtc  accgatccca  gggctgacca
3181 ccagccctcc  ccggaagcct  cctacgttaa  cctgccaccc  attgccctgt  gcaaacagga
3241 ccagctctct  cgctacgtgg  acatcgccat  ccgctgcaac  aacaaggtaa  ccatccatga
3301 ctgaactggc  gctggaccgt  ctgtgtccca  ccccggggcc  gccttctctc  gcacattgtt
3361 agagcttgga  gttgaggcca  ctggccgggt  aactcacaag  ttaggttagt  gtgctacacg
3421 aggggcaagt  ttttcgctaa  caccacaagg  gtctctggcc  caatgagtgg  agttggatag
3481 taatacttgc  tacaaaagta  tgattttaag  gagagatgaa  aatattttta  aaatagcctg
3541 ttttttttct  cttcaatatt  cctaaactct  ttcttaatac  tgtatcgtgc  tcgtgagatc
3601 ctaaaaaggt  ggggtaccgt  gtggttcaaa  ttggtgtttg  tcaactgatc  caaacctggc
3661 tacgcataag  aacggggcag  aggttttctt  ttatttctac  cagtattcag  gcaactgccc
3721 cattttgttc  ggtagagtgg  agtcttaatt  aaacaccatg  atttcgttgg  cagacaagat
3781 taagaaccag  agatagagaa  caatcttggt  gcaatctttg  ggttttgctt  taattggagt
3841 acagttttaa  gtgtgttatt  ggtttctgct  gtactaaaca  ctttcaaat  aacagtctgc
3901 tgacatggta  ccaagggacc  tagacgatga  ggggacaggt  cgggtggagt  gggggtgctg
3961 attactgttt  gggggttgcc  gaggtcgct  tgaacctggt  gctcttcag  ggggcgcact
4021 cagtgggcct  gatgtggtgg  atgctcgccc  ggaagtcct  gcgcagtcgc  ggcaccatct
4081 ccgagaaca  ccggtgggag  gtcagtcggg  acctctactt  ctacagggac  cccgaggagg
4141 tgagctccgt  ccacagaggc  gtgttgccac  tcacataagt  acatactggg  tacttcttac
4201 tgccaagaac  agaaattaat  ctgtcaatgc  atataaacta  aaaactattt  tcctaaacta
4261 gattgaaaag  gaagagcagg  cagcagccga  gaaggctgtg  accaaggagg  agtttcaggg
4321 cgaatggagt  gctccagctc  cagagttcac  ggctgccag  cctgaggtgg  cagactggct
4381 tgaaggtgtg  caggtgcctt  ccgtgcccat  tcagcagttc  cccactggta  cgtatcagga
4441 tccaagggca  tccagctggt  ggttttagaac  tgctcttctc  agtctgacat  atctgtagga
4501 ataaaagcag  attggtgcag  tggggttaca  aaagtaactg  gggagtgggc  tgatggcctt
4561 ctgtattttt  ctcaacagaa  gactggagtg  ctacgccttc  cactgaagac  tggctctgac
4621 ccccaactgc  ccaggccacg  gaatgggtag  gaaccaccac  cgagtggctg  taagctcttc
4681 ttccaaacac  ttgtagaact  tgcacaaaaa  tggaaactcg  g

```

LOCUS EF222474 683 bp mRNA linear MAM 15-MAY-2007
 DEFINITION Ovis aries laminin receptor precursor (LamR1) mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF222474
 VERSION EF222474
 KEYWORDS .
 SOURCE Ovis aries (sheep)
 ORGANISM Ovis aries
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 683)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Serrano,C., Lyahyai,J.,
 Martin-Burriel,I., Beattie,A.E. and Serrano,M.
 TITLE LamR1 as a candidate gene modulating scrapie susceptibility in
 sheep
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 683)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Serrano,C.,
 Lyahyai,J., Martin-Burriel,I., Alves,E. and Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (12-JAN-2007) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La
 Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..683
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9940"
 /PCR_primers="fwd_seq: gcagcaggaacccacttagg, rev_seq:
 cacctgcacgccttcaga"
 gene <1..>683
 /gene="LamR1"
 CDS <1..>683
 /gene="LamR1"
 /note="LRP/LR; ribosomal protein SA"
 /codon_start=2
 /product="laminin receptor precursor"
 /protein_id="ABQ42346"
 /translation="HLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATG
 ATPIAGRFTPGTFTNQIAAFREPRLLVVTDPRAHDHQLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNGAHSVGLMWWMLARE
 VLRMRTISREHPWEVMPDLYFYRDPEEIEKEEQAAAEKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTAAQPEVADWSE"
 ORIGIN
 1 ccacttaggt ggcaccaacc ttgacttcca aatggaacag tacatctaca aaaggaaaag
 61 tgatggcatc tacatcataa acctgaagag gacctgggag aagctgctgt tggccgctcg
 121 ggccattgtc gccattgaga acccggcgga cgtcagtgtc atctcctcca ggaacactgg
 181 ccagcgagct gtgctgaagt ttgctgctgc cactggagcc actcctatcg ctggccgctt
 241 cactccggga accttacta accagatcca ggccgccttc agggagccga ggcttctggt
 301 ggtcaccgat cccagggctg accaccagcc cctcacggaa gcctcctacg ttaacctgcc
 361 aaccattgcc ctgtgcaaca cggactctcc tctgcgctac gtggacatcg ccatcccgtg
 421 caacaacaag ggggcgcact cagtgggcct gatgtggtgg atgctcgccc gggaagtcc
 481 ggcgatgcgc ggcaccatct cccgagaaca cccgtgggag gtcatgccgg acctctactt
 541 ctacagggac cccgaggaga ttgaaaagga agagcaggca gcagccgaga aggctgtgac
 601 caaggaggag tttcagggcg aatggaccgc tccagctcca gagttcacgg ctgcccagcc
 661 tgaggtggca gactggtctg aag

LOCUS EF222473 822 bp mRNA linear MAM 15-MAY-2007
 DEFINITION *Oryctolagus cuniculus* laminin receptor precursor (LamR1) mRNA,
 partial cds.
 ACCESSION EF222473
 VERSION EF222473
 KEYWORDS .
 SOURCE *Oryctolagus cuniculus* (rabbit)
 ORGANISM *Oryctolagus cuniculus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Lagomorpha;
 Leporidae; *Oryctolagus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 822)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Gonzalez,C., Calvo,J.H., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Serrano,C., Lyahyai,J.,
 Martin-Burriel,I., Beattie,A.E. and Serrano,M.
 TITLE LamR1 as a candidate gene modulating scrapie susceptibility in
 sheep
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 822)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Gonzalez,C., Calvo,J.H., Alves,E. and
 Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (12-JAN-2007) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La
 Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..822
 /organism="*Oryctolagus cuniculus*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9986"
 /PCR_primers="fwd_seq: gcagcaggaacccacttagg, rev_seq:
 gtttatttccatcaacca"
 gene <1..822
 /gene="LamR1"
 CDS <1..779
 /gene="LamR1"
 /note="LRP/LR; ribosomal protein SA"
 /codon_start=3
 /product="laminin receptor precursor"
 /protein_id="ABQ42345"

/translation="IYKRKSDGIYIINLKRTWEKLLLAARAIVAIENPADVSVISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGTFT
 NQIQAAFREPRLLVVTDPRAHDHQLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWWMLAREVLRMRGTISRHPW
 EVMPDLYFYRDPEEIEKEEQAAAEKAVTKKEEFQGEWTAPAPEFTATQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPATDWSAAPT
 AQATEWVGTTTEWS"

ORIGIN

```

1  acatctacaa aaggaagagt gatggcatct acatcatcaa tctgaagagg acctgggaga
61  agctgctgtt ggcggctcgt gctattgttg ccattgaaaa ccctgctgat gtcagtgtga
121 tatectccag gaacactggc cagagagctg tgctgaagtt tgctgctgcc actggagcta
181 ctcccattgc tggccgcttc acacctggaa ctttactaa ccagatccag gcagccttcc
241 gggagccacg gcttctggtg gttaccgacc ctggggctga ccaccagcct ctcacggagg
301 catcttacgt gaacctgcct accattgctc tgtgcaaacac agactcgcct ctgcgctacg
361 tggacatcgc catcccgtgc aacaacaagg gagcccatc agtgggtctg atgtggtgga
421 tgctggcccg ggaggttctg cgcattgcgt gtaccatctc ccgtgaacac ccctgggagg
481 tcatgcctga tctctacttc tacagagatc ctgaagagat tgaaaaagaa gagcaggccc
541 ccgctgaaaa agctgtgacc aaggaggagt ttcagggtga atggacggcc ccagcggccc
601 agttcactgc tactcagccc gaggttgctg actgggtccga aggcgtgcag gtgccctctg
661 tgccatttca gcagttcccc actgaggact ggagtgtcga gcccgccact gaagactggt
721 ctgcagcgcc cactgccag gccaccgagt ggggtgggaac aaccactgag tgggtctagg
781 ctgcttgtca cgggctctca cgcaaacatg gaaatgtggt tg //
```

LOCUS DQ983231 5917 bp DNA linear MAM 20-SEP-2007
 DEFINITION Ovis aries heat shock protein alpha (HSPCA) gene, complete cds.
 ACCESSION DQ983231
 VERSION DQ983231 GI:115503918
 KEYWORDS .
 SOURCE Ovis aries (sheep)
 ORGANISM Ovis aries
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5917)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
 Lyahyai,J., Martin-Burriel,I. and Serrano,M.
 TITLE Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene:
 distribution of polymorphisms among sheep with different responses
 to scrapie
 JOURNAL Cell Stress Chaperones (2007) In press
 REFERENCE 2 (bases 1 to 5917)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Alves,E. and Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-SEP-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La
 Coruna Km. 7.5, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..5917
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9940"
 gene 1089..5721
 /gene="HSPCA"
 mRNA join(1089..1200,1657..1818,1911..2277,2581..2714,
 3002..3322,3491..3656,3831..4021,4130..4277,4439..4707,
 4996..5329,5612..5721)
 /gene="HSPCA"
 /product="heat shock protein alpha"
 CDS join(1657..1818,1911..2277,2581..2714,3002..3322,
 3491..3656,3831..4021,4130..4277,4439..4707,4996..5329,
 5612..5721)
 /gene="HSPCA"
 /codon_start=1
 /product="heat shock protein alpha"
 /protein_id="ABI99473"
 /db_xref="GI:115503919"
 /translation="MPEETQAQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIF
 LRELISNSSDALDKIRYESLTDP SKLDSGKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKAD
 LINNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDQY
 AWESSAGGSFTVRDTGTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKHSQFIGYPI
 TLFVEKERDKESDDEAEKEDKEEKEKEKESDDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDKK
 KKKIKIKEYIDQEELNKTPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEG
 QLEFRALLFVPRAPFDLFENRKKKNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLNFIIRGVVDS
 EDLPLNISREMLQQSKILKVIRKNLVKKCLELFTELAEDKENYKFFYEQFSKNIKLGI
 HEDSQNRKKLSELLRYYSASGDEMVS LKDYCTRMKENQKHIYYITGETKDQVANSFAF
 VERLRKHGLEVIYMI EPIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKKKQEEKK
 TKFENLCKIMKDILEKKVEKVVS NRLVTSPCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNS
 TMGYMAAKKHLEINPDHSIIETLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDP
 QTHANRIYMIKLG LIGIDEDDPTADDSSAAVTEMPPLEGDDDTSRMEEVD"
 variation 2495
 /gene="HSPCA"
 /replace="c"
 variation 2506
 /gene="HSPCA"
 /replace="g"
 variation 2510
 /gene="HSPCA"
 /replace=" "
 variation 2514
 /gene="HSPCA"
 /replace="a"
 variation 2639
 /gene="HSPCA"
 /replace="a"
 variation 3961
 /gene="HSPCA"
 /replace="g"
 variation 3967
 /gene="HSPCA"
 /replace="g"

variation	3994	/gene="HSPCA"				
		/replace="c"				
variation	4015	/gene="HSPCA"				
		/replace="c"				
variation	4192	/gene="HSPCA"				
		/replace="g"				
variation	4497	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5169	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5369	/gene="HSPCA"				
		/replace="a"				
variation	5413	/gene="HSPCA"				
		/replace="g"				
variation	5494	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5507	/gene="HSPCA"				
		/replace="c"				
variation	5534	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5549	/gene="HSPCA"				
		/replace="c"				
variation	5568	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5640	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5697	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5703	/gene="HSPCA"				
		/replace="t"				
variation	5835	/replace="c"				
BASE COUNT	1462 a	1372 c	1685 g	1395 t	3 others	
ORIGIN						
1	cctggcgggc	taccgtcgca	gagttggaca	cgactgagcg	actaagcaca	gcacaaagta
61	ggtacaaagg	ctcaaaagac	taagcaaaagg	ccgggagaaat	tcgggactgt	gtcccctttt
121	aacattcccc	gcgccaccgc	tccccctgcc	ttgggcgcaa	tcgggcctaa	ggacaggacg
181	agtcgccata	ctggagtggc	gggggaatgg	tggtttgttc	cagggccac	ctctgggtca
241	gaaccagccg	aatagaccca	cgaggctctg	gagttccct	ctgctcccc	tgcacacacg
301	ctggtcacc	ctcgctcaca	gaccgctgca	ccccacaacc	aggctggggc	tctgagcctc
361	cgcgttaacg	aggctctggc	aggcacttgt	tgcccgaatt	cctagggccc	tgaacctata
421	accgtcgccc	ctggcaaaaga	gatgcgccct	agaccctcta	atcgctgccc	ggaccccccc
481	aaacccttaa	ccatggacct	gagcctgcga	tcaatgcccc	aagcatatac	ctgtgacaag
541	ggactggacc	cctcaccocg	gctttgatcc	cctaagcgcg	gcctcaaggc	tcgaaacctg
601	gccccaggcc	cataggcggg	gggtcccgat	gctgggggga	tccggagcgc	acactatctg
661	gggacacgct	tgaaccaccg	agagtttact	ttcttgga	tcccagagct	gctggcacgg
721	gcgatcagcc	cccggggcct	ggacagaggt	ttgggtcggg	ggagcgtag	gccgacgcgc
781	gccaagcggg	gttggcgggc	cagcgggtgtg	aggccggcgg	ggcgacagac	gccgcgcgc
841	ggggtaggta	gggctgggaa	cggcggcacc	ggaaggcgcg	agaccgcgcg	gaacgctccg
901	gatagcgcag	gcgcactgcg	gcgggcgcgg	gcacgcttgg	cacgcagggc	ccctgaggcg
961	tgggagcgcg	cggcgcgggc	ccgaggaggg	ggcgggcggc	ctccagtgcg	caggcgagg
1021	cgcgcggcgc	ctccggcggt	tgggagggt	tcttcggaa	ggttcgggag	gcttctggaa
1081	aaggcgccgc	gcgctgggcg	ggcccgcctc	tatataagg	cggcgcgggg	gcggcgcgcc
1141	agttgcctct	gcgtcccgt	gctgcgtcgc	tgcgagccc	gtgctagtcc	ttcagccaag
1201	gtgaggggag	gcggttgtag	ggggacgcgg	ggatccacgg	gcgggtgggc	ggcggcgagg
1261	gcagcccccg	gagccccctg	aggcggcgcg	gcccggggcg	gcccgtgatta	accggttagg
1321	cctcgggcct	gcggcggtct	cccgtcccct	cccccccgc	ctccccccgc	cgtcgggagc
1381	gagtgggccc	cgggctccg	gggtcgtcgc	ggatggtgag	ggccggggtc	tgccggcccg
1441	gaggggggtc	cccgggcccgc	gggtgggggc	gcccggggcg	agcggcggcc	gtgcgccgg
1501	cgtgggcgcg	ggcggcagcg	gcggcgcccg	gcccccgaa	tgaggtcatc	ctttgtcagc
1561	ggcgccctcc	cgcgcgcccc	ggtctcggga	gcgggagcga	gacgcggcgg	ggaggggtcc
1621	cggcggtggc	ctcacgggct	ccgcgttccc	cggcagatgc	ccgaggagac	ccaggccacg
1681	gaccagccga	tggaggagga	ggaggtggag	acgttcgcct	tccaggcgga	aattgcccag
1741	ttgatgtcac	tgatcatcaa	cactttctac	tcgaataaag	agattttcct	gagggagctg

```

1801 atttcaaact cgtcagacgt aagtctcatt gcggagtgagg gtgtttgtgt gaaagggcan
1861 ctgttttagg ggggaagttg cgtgtcatca cgtgtctttt ttaaataagag gccctggaca
1921 agatcaggta tgagagcttg accgatccca gtaaattaga ctcggggaaa gagctgcaca
1981 ttaatctcat accgaacaag caagatcgaa ccttcacat cgtggacacc ggcattggga
2041 tgaccaaggc cgatttgatt aataatctgg gcaccatcgc caagtctggg accaaagcgt
2101 tcatggaggc tttgcaggct ggcgtgata tctccatgat tggccagttt ggtgtcgggt
2161 tttattcagc ctatttggtg gctgagaaag tgaccgtcat caccaaacat aacgatgatg
2221 agcagtatgc ctgggagttc tctgcaggag ggtccttcac agtgaggact gacacaggta
2281 ggcacccgag aacagggttg ggtgctttag gcaactggag cccaaagaag ggggtaagtt
2341 tgtgtgtagc gtttaaaaac ctgtttgcct ggaggggtgat agcatgcaca tgcacttgtg
2401 gttggttatc cttgggcaag cctttaactg cctgagact ctgcccagtt gtagtaacca
2461 caagcttctg cttcatagac ttttcggata actgtcctag agagcaaaat agtgtttttt
2521 tttgccttga tcaggccatt gtgattgaaa ttggcctcaa tctctggact tcttttcag
2581 gagaaccgat ggggcgtgga acaaaggtta ttctgcattc gaaagaagac cagactgagt
2641 accctggagg cggaggaata aaggagattg tgaagaagca ttctcagttc attggctatc
2701 ccatcactct ttttgtgagt ttccatgtat cctgtatatg taggttacta aagtgtattg
2761 actgaaatcc tgttagtctc tctgtctttt tataagagat ccaaacttgc actaatttcc
2821 tgggctggtg ggtcgactcc tgtcaaggtt cccagggtcg ttaatagatc cttcagaaat
2881 gttggttagt cttgttgagt actagtgttt cctagtgact attggtgtaa gtgctgcagt
2941 ctcttttagc ctttttcccc cagttttgtg gagaggtgac gtgatttgtc ctcttttgaa
3001 ggtggaaaag gaacgtgata aagaagttag cgatgatgaa gcagaagaga aggaagacaa
3061 agaggaagag aaggagaaag aagaaaagga gtctgatgac aagcccagaga tagaagacgt
3121 tgggtcagat cggaggaaga aagagaagaa ggaatgggag aagaagaaga agaagaagat
3181 caaggagaag tacatcgatc aagaagagct gaacaagaca aagcctatct ggaccagaaa
3241 ccctgatgac atcactaacg aggagtatgg agagttctac aagagcctga ccaacgactg
3301 ggaggaccac ttggcgggtc aagtgagtga ctgctaagtg cttcctttctc tgcagatgtt
3361 ggaggtgca tctgttctc cgatgcccc tgctttgcc agagtcatgt tcaggttaact
3421 ccggtatcag tgacattttt tattgtctca agttgtttgc cctgtgttaa tcttgattgt
3481 tttattacag cttttttcag ttgaaggaca gtggaattc agagcccttc tttttgtccc
3541 aagacgagct ctttttgacc tgtttgaaaa cagaaagaag aagaacaaca ttaagttgta
3601 tgttcgaaga gttttcatca tggataactg tgaggagcta atccctgaat acctgagtaa
3661 gtatagttc atagaagaaa ctgtcactgt tactagtata agagattaat cctgtcagct
3721 cctggttttt aaactaaaca tggggaaaat cattcatctt tgggtttttt ggtttacgga
3781 tttgtcagtt tttgtttttg gagtgcactg ctgcatttgg tctgtttcag atttcattag
3841 aggtgtggtg gattctgagg atcttctct gaacatttcc cgtgagatgt tgcacaaaag
3901 caaaattttg gaaattatca ggaagaattt ggtcaaaaag tgcttggaac tcttactga
3961 actggcagaa gataaggaga actacaagaa gttttatgag cagttctcta aaaatattaa
4021 ggttggttag aaacacattt gactattaag agtagtaatc aaactgattt tctttttgaa
4081 ataattgaac acagagaaag tctttctaaa gctaacattg tcttttcagc ttggaataca
4141 tgaagattcc caaaatcgga agaagcttcc agagctgttg aggtactata cttctgcttc
4201 tgggtgatgag atggtttctc tcaaggacta ttgcacaaga atgaaggaaa accagaaaca
4261 catctattac atcacaggta ccttacaggc aataactgtg acagtcgact tttttgtgat
4321 cccataggaa cagttgcacg ttttctaccc gtgtggtggt acacataatt tagtaggagt
4381 taatctaacc gaaataaatg agactgctgt taaaagatat aaaactctgt ttctctaggt
4441 gagacaaagg accaggtagc caactcggcc tttgtggagc gtctccggaa gcatggcttg
4501 gaagtgatct acatgattga gcctattgat gagtactgtg tgcaacagct gaaggagttt
4561 gaggggaaga ccttagtgc agtcaccaa gagggcctgg aacttccaga agatgaggaa
4621 gagaaaaaga aagaagaaga gaaaaagaca aagtttgaaa acctctgcaa aatcatgaag
4681 gacatttttg agaagaaagt tgaaaaggtg tgtgaatacc atcttttttc ttatattttc
4741 tggttactaa cccttcttag ggtgtcagg tgtcttttga acaagtcaca tacacatagt
4801 ccttaacatc tttaaagaca ttagaactta aaaggaactt aaagcttcgg atttgcaata
4861 gtatttgcaa atagtatttn tgattcatta atactcaagt tcttaataa ttcaaataaa
4921 cctggtgaca agcactgaga atggaacacc tctgtgcccc gttatcgctg tatacttttt
4981 tttttttaat gaaaggtggt cgtgtccaac cggctggtga cctcccctg ctgcattgtc
5041 acaagcacat acggttgagc agcaaacatg gagcggatca tgaaggcgca agccctgaga
5101 gacaactcga cgatgggtta catggcagcc aagaagcacc tggagatcaa cctgacctt
5161 tccatcatcg agaccttgag gcaaaaggca gaggtgaca agaatagaca gtctgtgaag
5221 gatctggtca tctgctgta cgaacacagc ctctgtctt ctggcttcag tctggaggat
5281 cccagacac acgccaacag gatctacagg atgatcaaac ttggtcttgg taagccttgt
5341 gcaagtacca tgtgtaatac cattggggga aaacctaaac agatgactgt tgaaaagggt
5401 gaactttcag caatttcaac aaagttgggc actcttgttt ttccatttgc aaaacactga
5461 agtcacatga gttaaaagg ggtaaataag ccccttctgt catgtcgctt ctaattcgct
5521 cagccttgag aagcgggtat gaggaacctg tagtgttgg ctaattatgc ggcttgaaga
5581 aacttaatcc gtgtttttta ttctctcaa ggtattgacg aggatgacct cactgctgac
5641 gacagcagcg ctgcagtcac tgaggaaatg ccgcccctgg aaggagacga cgacacgtcc
5701 cgcatggagg aagtagactg agcgtgccc aggctcgctt ggcgtgtgtg tcaacgcgct
5761 gtctccgttc cctccaatat gttctcgagt atttctttat ttttgttaac attttaaatac
5821 tgtatggcat gacaactgca taaggggagg ataagatttc ttatactaa gtgtgatact
5881 gtgatacttt tagcactaaa cgaaanccta gtaataa //

```

LOCUS EF091713 2304 bp mRNA linear MAM 28-FEB-2007
 DEFINITION *Ovis aries* heat shock protein 90 alpha (HSPCA) mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF091713
 VERSION EF091713
 KEYWORDS .
 SOURCE *Ovis aries* (sheep)
 ORGANISM *Ovis aries*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2304)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
 Lyahyai,J., Martin-Burriel,I., Alves,E., Zaragoza,P., Badiola,J.J.
 and Serrano,M.
 TITLE HSP90-alpha as a candidate gene modulating scrapie susceptibility
 in sheep
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2304)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Serrano,C.,
 Lyahyai,J., Martin-Burriel,I., Zaragoza,P., Badiola,J.J., Alves,E.
 and Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-OCT-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La
 Coruna Km 7,5, Madrid 28040, Spain
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..2304
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9940"
 gene 1..2304
 /gene="HSPCA"
 CDS 1..2171
 /gene="HSPCA"
 /codon_start=3
 /product="heat shock protein 90 alpha"
 /protein_id="ABO21406"
 /translation="DGGEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDA
 LDKIRYESLTDPKSLDSGKELHINLIPNKQDRTLITIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKS
 GTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFT
 VRTDTGEPMGRGRTKVLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKHSQFIGYPITLFEKERDKE
 VSDDEAEKEEDKEEKEKEEESDDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDKKKKKIKKEYID
 QEELNKTPIWTRNPDITNEEYGEFYKSLXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XQQSKILKVIKRLNVKKCLELFTLAEDKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLS
 ELLRYTASGDEMVSLLKDYCTRMKENQKHIIYITGETKDQVANSFAVERLRKHGLEV
 IYMIPIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMK
 DILEKKVEKVVSNRLVTSPPCIVTSTYGTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHL
 EINPDHSIIETLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPTQTHANRIYRMI
 KLGLGIDEDDPTADDSSAAVTEEMPPLLEGDDDTSRMEEVD"
 922..1181
 /estimated_length=260
 gap
 ORIGIN
 1 ccgatggagg agaggagggt gagacgttcg ccttccaggc ggaaattgcc cagttgatgt
 61 cactgatcat caacactttc tactcgaata aagagatttt cctgaggggag ctgatttcaa
 121 actcgtcaga cgcctctggac aagatcagggt atgagagcgt gaccgatccc agtaaatagg
 181 actcggggaa agagctgcac attaatctca taccgaacaa gcaagatcga accctcacca
 241 tcgtggacac cggcattggg atgaccaagg ccgatttgat taataatctg ggcaccatcg
 301 ccaagttctg gaccaaagcg ttcattggagg ctttgcaggc tggcgctgat atctccatga
 361 ttggccagtt tgggtgctgg tttatttcag cctatttggt ggctgagaaa gtgaccgtca
 421 tcaccaaaaca taacgatgat gagcagtagt cctgggagtc tctgcaggaa ggtctctca
 481 cagtggaggac tgacacagga gaaccgatgg ggcgtggaac aaagggtatt ctgcatttga
 541 aagaagacca gactgagtag ctggaggagg ggagaataaa ggagatttgg aagaagcatt
 601 ctacgttcat tggctatccc atcactcttt ttgtggaaaa ggaacgtgat aaagaagtta
 661 gcgatgatga agcagaagag aaggaagaca aagaggaaaa gaaggagaaa gaagaaaaag
 721 agtctgatga caagcccag atagaagacg ttggctcaga tgaaggagg gaagagaaga
 781 aggatgggga caagaagaag aagaagaaga tcaaggagaa gtacatcgat caagaagagc
 841 tgaacaagac aaagcctatc tggaccagaa accctgatga catcactaac gaggagtagt
 901 gagagttcta caagagcctg annnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 961 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 1021 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 1081 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 1141 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ncaacaaagc aaaattttag
 1201 aagtattcag gaagaatttg gtcaaaaagt gcttggaact cttcactgaa ctggcagaag
 1261 ataaggagaa ctacaagaag ttttatgagc agttctctaa aaatattaag cttggaatac
 1321 atgaagattc ccaaaatcgg aagaagcttt cagagctgtt gaggtagtat acttctgctt
 1381 ctggtgatga gatggtttct ctcaaggact attgcacaag aatgaaggaa aaccagaaac
 1441 acatctatta catcacaggt gagacaaagg accaggtagc caactcggcc tttgtggagc
 1501 gctcccgaa gcatggcttg gaagtgatct acatgattga gcctattgat gagtactgtg
 1561 tgcaacagct gaaggagttt gaggggaaga ccttagtgtc agtcaccaaa gagggcctgg
 1621 aacttcacga agatgaggaa gagaaaaaga aacaagaaga gaaaaagaca aagtttgaaa
 1681 acctctgcaa aatcatgaag gacatttttg agaagaaagt tgaagaggtg gtcgtgtcca
 1741 accggctggt gacctccccg tgctgcattg tcacaagcac atacggctgg acagcaaaaca
 1801 tggagcggat catgaaggcg caagccctga gagacaactc gacgatgggt tacatggcag
 1861 ccaagaagca cctggagatc aaccctgacc attocatcat cgagaccttg aggcacaaag
 1921 cagaggctga caagaatgac aagtctgtga aggatctggt catcctgctg tacgaaacag
 1981 cgctcctgtc ttctggcttc agtctggagg atccccagac acacgccaac aggatctaca
 2041 ggatgatcaa acttggtctt ggtattgacg aggatgaccc cactgctgac gacagcagcg
 2101 ctgcagtcac tgaggaaaat ccgccctcgg aaggagacga cgacacgtcc cgcattggag
 2161 acctagactg agcgtgcgag aggcctgcct ggcggtgtgt tcaacgcgct gctctcgttc
 2221 cctccaatat gttctcagat atttctttat tttgtttaac atttaaaatc tgtatggcat
 2281 gacaactgca taaggggagg ataa

LOCUS DQ831948 327 bp DNA linear MAM 07-AUG-2006
DEFINITION Ovis aries interleukin 1 beta (IL1B) gene, 5' upstream enhancer region.
ACCESSION DQ831948
VERSION DQ831948.1 GI:111118813
KEYWORDS .
SOURCE Ovis aries (sheep)
ORGANISM [Ovis aries](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 327)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Goudarzy,K., Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C., Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and Serrano,M.
TITLE Location, partial characterization and differential expression of two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in sheep
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 327)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C. and Serrano,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-JUN-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..327
/organism="Ovis aries"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[9940](#)"
[gene](#) <1..>327
/gene="IL1B"
/note="interleukin 1 beta"
[enhancer](#) <1..>327
/gene="IL1B"
/note="5' upstream enhancer region"
[variation](#) 274
/gene="IL1B"
/replace="c"
ORIGIN
1 ttttggggac cggaaggaag tgctggggcc tgagtcgtcc tcttggaag actgttttta
61 atacaggcat tgtgcaatct gtgtgcttga cacaataaga ggtttcactt cctgagatgg
121 acaggatgct gccaggtttt gtgtccaggc cacagggttg ggatgagaca gggcagaact
181 gtaaagatta ctacgtcaag gggcattgcc ccacggctcc aaaatttccc ttgaacagaa
241 agaatgaggg ctcatgcacc ctggatactg gtggatgaag aagatggaga agtaatttca
301 ttctgacact ctatctcaag tcccaga

LOCUS DQ128078S1 2661 bp DNA linear MAM 06-FEB-2007
 DEFINITION *Ovis aries* interleukin-1 beta (IL1B) gene, exons 1 through 3.
 ACCESSION DQ128078
 VERSION DQ128078.1 GI:110084907
 KEYWORDS .
 SEGMENT 1 of 2
 SOURCE *Ovis aries* (sheep)
 ORGANISM *Ovis aries*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Caprinae; *Ovis*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2661)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K.,
 Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
 Lyahyai,J., Martin-Burriel,I., Alves,E., Zaragoza,P., Badiola,J.J.
 and Serrano,M.
 TITLE IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie
 susceptibility in sheep: localization, partial characterization,
 and expression
 JOURNAL Mamm. Genome 18 (1), 53-63 (2007)
 PUBMED 17242860
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2661)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Alves,E., Gonzalez,C. and
 Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-JUL-2005) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La
 Coruna, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2661
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9940"
 variation 22
 /replace="c"
 variation 110
 /replace="g"
 variation 151
 /replace="a"
 variation 307
 /replace="t"
 gene order(585..2661,DQ128079.1:1..>1854)
 /gene="IL1B"
 mRNA join(585..638,1242..1303,2067..2115,DQ128079.1:752..950,
 DQ128079.1:1738..>1854)
 /gene="IL1B"
 /product="interleukin-1 beta"
 exon 585..638
 /gene="IL1B"
 /number=1
 variation 610
 /gene="IL1B"
 /replace="a"
 variation 657
 /gene="IL1B"
 /replace="c"
 variation 787
 /gene="IL1B"
 /replace="a"
 variation 795
 /gene="IL1B"
 /replace="c"
 variation 871
 /gene="IL1B"
 /replace="t"
 variation 942
 /gene="IL1B"
 /replace="g"
 variation 1142
 /gene="IL1B"
 /replace="t"
 variation 1196
 /gene="IL1B"
 /replace="a"
 variation 1225
 /gene="IL1B"
 /replace="c"
 exon 1242..1303
 /gene="IL1B"
 /number=2
 CDS join(1257..1303,2067..2115,DQ128079.1:752..950,
 DQ128079.1:1738..>1854)
 /gene="IL1B"
 /codon_start=1
 /product="interleukin-1 beta"

```

/protein_id="AAZ99671.1"
/db_xref="GI:74101446"
/translation="MATVPEPINEVMAYSDENELLFEVDGPKQMSCTQHLDLGSMG
DGNILQLQISHQLYNKSFRQVVSIVAMEKLRSRAYEHVFRDDDLRSILSFIFEEEPVI
FETSSDELLCDAVQSVKCKLQDREQSLVLDSPW"
variation 1472
/gene="IL1B"
/replace="t"
variation 1677
/gene="IL1B"
/replace="t"
variation 1880
/gene="IL1B"
/replace="t"
variation 2029
/gene="IL1B"
/replace="a"
exon 2067..2115
/gene="IL1B"
/number=3
variation 2072
/gene="IL1B"
/replace="c"
variation 2276
/gene="IL1B"
/replace="t"
variation 2376
/gene="IL1B"
/replace="g"
ORIGIN
1  cccagctcca tctgaagcct gggtcacctgt gttttccctg cctcatccta gcaagatcaa
61  atgtctcccc agaggcttca gtaattgacc cagagcctcc aaggcagaaa acagcatgat
121 gggtttcggaa ttcgcagggt tactgtcact ttcctatgct cacttattta tctccaagtg
181 agaagtttcc taaacttatg tgcaaggagt gagcgaggga gcatttctgt gtgtgtgcct
241 ctgtgtgtcc tccaatttgt tcccagagat ccaaaattaa aacatccttc ttacctagga
301 aaacccta ttttggttgg acaccatctg cacaatagtt gtcagaaaaa ccaacatata
361 tttgcataat gacacatttg caagaatgtg tcacagtttg ctatcacttg cctcccaag
421 gactggagaa ttatttctct cccagaagtt accatcaatc ctttttttta aaacttggtt
481 gtgaaatcag ttaaccaaag gggaaatctc tcagctctcc acttctgctt ttgaaggcca
541 taaaataagt gggagaaacc agcagacagt ataccgctt ggaggcacag caagccatcc
601 agggatcctg ttctctccag ccaaccttca ttgcccaggt accactttaa ttcttcttcc
661 tgactaggtc ttaagggagt ctgctctctt tttcctgtct tctccctctt tctcttctct
721 ctctgcctga cagctgggct ttctgcaaaa ctgccagctg tgttataata ccataacttg
781 caaaattata ggggaattaa tatcacttgt ctagcagctt acatctgaga gctcgggatc
841 ctacctccac ccagatcac ttaagagatc cgctcctggt ttgggcttgg ttagcaaat
901 gctttactct ggacctctgt ggctcagctt gtaaagaatc cacctgcaat gtaggagaca
961 tgggttctat ccttgggttg ggaagatccc ctggagaagg gaaagactac ccactccagt
1021 actctggcct tgagaattgc gaagagtcag acacagctga gtgactttca cttactctga
1081 acccaaggta gactttcgt gcattcactc attcatttga aaatggcttc tttgcttgcc
1141 tgccaggtaac aagatgctga gggcaattca catgtgaaga aggcagccct catggggact
1201 ggcattggcaa atgggtcactc atttttctcc tctttgcaca ggtttctgaa acagccatgg
1261 caaccgtacc tgaaccattt aatgaagtga tgggttacta caggctcagt ggaaaattga
1321 caccaattgt gctagcaggg ctttctctctc aagaatggat ttttatatgt gcttagagac
1381 cagattttgt tcccaactg cctcttacag tggcaagcac ggttccaagt caacctgggt
1441 taaggactga tgtcccactg caagtcacag cgtggcacc ctaggccacc cagatcctgc
1501 ttcaggggct tcttgcatag ggaacacagg aagaagatt ccaagtggac aatccagggg
1561 accccttgcc agatttggtt taactgagga ggaaagctca gattttcacc aggctggaag
1621 ttaggtctca ggataaaaca gagagctcag acagcaacgg gtacctgccc tcttcccggt
1681 ctgtcccactg tatactaccg tggcaactac ctgcttcagg cagccctaag gaacacgttg
1741 tttgcagttt cctattgccc agcttcccag gtggctcagt gggtaagaa tctgcctgca
1801 atgcaggaga tgcaggaggg gcagcagaca tgggttcgat ccttgagttc agaagatgcc
1861 ctggacaagg gcatggcaac actccagtat tcttgctcgg agaatcccat ggacagagga
1921 gcctgggtgg ctacaggatt gcaaagattt ggacacgact gaagcaactt agcacatatg
1981 cattgatggt gaagattatc attgaggaag aaaagctaata ctgtccagg agatgtaatt
2041 gagcaatttt tctgttttta ttacagtgat gagaatgagc tgttatttga ggttgatggc
2101 cccaaacaga tgaaggtgag tctatgggct ttgatcccaa catggtgagg ggctctgaca
2161 gaggaagagac tcagggaagt gttctgggccc ggcttggtcc tatggaattt tgtgatggaa
2221 tgactttctc ctcttccagt gagacaaatg gaagctggcc actccgcaac tcccacgcca
2281 ccagtgtttc gctgaggctt ggtgatgctg gccatgcttg cagaggcttt tagaagggga
2341 atttaagtag agatagtgtc tgcctgtctc tgtaagaag acagttcagg cttccaagca
2401 aatttaattc ttcttttagg agagggttcc agctctaaaa gtgatgaagc tacattaatc
2461 acttgaactg aacctgacct agagatgatg accttgggaa tgaatatgtc cgctcctttt
2521 aagggtggga ttgttttttg ctgctggaag tggagcttaa agacaacaag tcatgatgta
2581 aacaaaaagt tgantttggg agttacnana aaattattca ctgcncttg gatcttganc
2641 aantcatttt acccctttga t

```

LOCUS DQ128078S2 1854 bp DNA linear MAM 06-FEB-2007
 DEFINITION *Ovis aries* interleukin-1 beta (IL1B) gene, exons 4, 5 and partial cds.
 ACCESSION DQ128079
 VERSION DQ128079.1 GI:110084910
 KEYWORDS .
 SEGMENT 2 of 2
 SOURCE *Ovis aries* (sheep)
 ORGANISM [Ovis aries](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; *Ovis*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1854)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Moazami-Goudarzi,K., Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C., Lyahyai,J., Martin-Burriel,I., Alves,E., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and Serrano,M.
 TITLE IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression
 JOURNAL Mamm. Genome 18 (1), 53-63 (2007)
 PUBMED [17242860](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1854)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Alves,E., Gonzalez,C. and Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-JUL-2005) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La Coruna, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1854
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:[9940](#)"
[gene](#) order(DQ128078.1:585..2661,1..>1854)
 /gene="IL1B"
[mRNA](#) join(DQ128078.1:585..638,DQ128078.1:1242..1303,DQ128078.1:2067..2115,752..950,1738..>1854)
 /gene="IL1B"
 /product="interleukin-1 beta"
[CDS](#) join(DQ128078.1:1257..1303,DQ128078.1:2067..2115,752..950,1738..>1854)
 /gene="IL1B"
 /codon_start=1
 /product="interleukin-1 beta"
 /protein_id="[AAZ99671.1](#)"
 /db_xref="GI:74101446"
 /translation="MATVPEPINEVMAYYSDENELLFEVDGPKQMKSCQHLDLGSMG
 DGNILQLQISHQLYNKSFRQVVSVIVAMEKLRSRAYEHVFRDDDLRSILSFIFEEEPVI
 FETSSDELLCDAAVQSVKCKLQDREQKSLVLDSPW"
[variation](#) 92
 /gene="IL1B"
 /replace="a"
[variation](#) 98
 /gene="IL1B"
 /replace="a"
[variation](#) 618
 /gene="IL1B"
 /replace="t"
[variation](#) 686
 /gene="IL1B"
 /replace="c"
[variation](#) 718
 /gene="IL1B"
 /replace="t"
[exon](#) 752..950
 /gene="IL1B"
 /number=4
[variation](#) 1006
 /gene="IL1B"
 /replace="g"
[variation](#) 1017
 /gene="IL1B"
 /replace="t"
[variation](#) 1046^1047
 /gene="IL1B"
 /replace="cccctcct"
[variation](#) 1449
 /gene="IL1B"

```

variation      /replace="g"
               1653
               /gene="IL1B"
               /replace="a"
exon           1738..>1854
               /gene="IL1B"
               /number=5

```

ORIGIN

```

1  caagcaactt cagttaaggt ttaatgcagt tagttaaaca gtttctctga attgaggaac
61 tattttcgcaa tagtcaccac tttttgcagg atgctttatga ggaagcattt gagaaaaaga
121 ttgtagagaa cactgttgat tgggcagagg catattgaaa atctaatacat catggccatg
181 aaaaatgaaa tacataacat tgggtgcatta cgcttccaaa aagataaata gtgtaagaag
241 gtataagttt atgggttaggt ggagcgtgta taagaaaaga taaggtaaga atggatttat
301 tctagaagaa tgttgtatag tgcattagaa agcttacatt atgggttagg gtctgcctct
361 cactggccgc tatgtttttg gataagccac ttaacctctc tgggttgccg agagatgaaa
421 gtttatcttt agaagctctg ttatctcttc cttgggcttc ccagggtggc cagtggtaaa
481 gaatctgccc atcaatgcag gagatgcagc gggtttgatc cttgggtcca gaagactccc
541 tggaggagaa aatggcaacc cacttttagt ttcttgctcg cagaatccca tggatagagg
601 agcctggcga caggccacgg ggtctctgag tgtcagacat gattgagtgg ctgagcatgc
661 atgaatctcc tttctctctc tctcttgtgt caaaacggga gtcgtctggc ccaaccacct
721 tcccacactg acttcttttg tcccttcaca gagctgcacc caacacctgg acctcggtc
781 catgggagat ggaacatccc agctgcagat ttctcaccag ctctacaaca aaagcttcag
841 gcaggtagtg tcggtcatcg tggccatgga gaagctgagg agccgtgcct acgaacatgt
901 cttccgtgat gatgacctga ggagcatcct ttcattcatc ttogaagaag gtacctaatg
961 agagctgagg gcagacatga gatcgctggt catttccttc tcagaagcca taaccaaca
1021 gtcataacac cccgcctccc ccgcctgagg ctgaaacctt taaaagtag agggccagat
1081 aatgagagga aaacagagac acctagaaac ccagttaatc atctcttcag ttgaaactcg
1141 tctttttttc gttttgtctt ccatcagatt gatttgctcc cttaaaagat tttttaagga
1201 attcttcctt aatgaaataa tgatgtaact gactaatcat gctatgcatt taaaattat
1261 ggaagctttt ccagaattta cagacctgca taaaatggta cccaaaatgt tacatttcaa
1321 tacactactg tataaaagcc aacttggtga tggtttaagt ctctttttta gttgttgaaa
1381 ctattcttaa aataggacct tggtaactac tcatatttgc aaagcagcca accattctgt
1441 atgctttcat ttacattata tcctgcgaat ctcagaatgt ccttggtggg ccacatctgt
1501 tgccaccacc attttacata agggattcca tggctcatcc acggcaagta atagagctga
1561 agtttgaacc tacatcttag ggtgccaggc tcagtgttct gaccacccc aacttcttct
1621 ccaactgatg aatcaagcat cagctaggca tgctcagatg tcctccaagg aaacaaattc
1681 tgccctcccat catcacctgg gcactctcct aaacaagggt tgtgttccac atttcagagc
1741 ctgtcatctt cgaacatccc tccgatgagc ttctgtgtga tgcagcgtg cagtcagtaa
1801 aatgcaaaact ccaggacaga gagcaaaaat ccctggtgct ggatagccca tggg

```

//

LOCUS DQ831949 2307 bp DNA linear MAM 07-AUG-2006

DEFINITION *Ovis aries* interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene, 5' flanking region and partial cds.

ACCESSION DQ831949

VERSION DQ831949.1 GI:111118814

KEYWORDS .

SOURCE *Ovis aries* (sheep)

ORGANISM [Ovis aries](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2307)

AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Goudarzy,K., Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C., Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and Serrano,M.

TITLE Location, partial characterization and differential expression of two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in sheep

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2307)

AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C. and Serrano,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-JUN-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra La Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..2307

/organism="Ovis aries"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:9940"

[misc_feature](#) 1..2027

/note="5' flanking region"

[gene](#) 2028..>2162

/gene="IL1RN"

[mRNA](#) 2028..2162

/gene="IL1RN"

/product="interleukin 1 receptor antagonist"

[CDS](#) 2153..>2162

/gene="IL1RN"

/note="IL-1Ra"

/codon_start=1

/product="interleukin 1 receptor antagonist"

/protein_id="ABH05925.1"

/db_xref="GI:111118815"

/translation="MAL"

ORIGIN

1 agcctggctc tgacacccgg caccttgac cgtgcatccc ctggtctgac tttaggcccc

61 atcgtggggt ganccgagga gctagcccag gcccgagaca tggntggggg accatgaact

121 gctcctccca gacacatttg aatgataaac cttccctcaa actgctggcc tgtccttcca

181 ggacagagga gatacacttg gaggtagtgg gatccanatg gggggcagcc accaacctgg

241 cctccagttc acctgtgccc caagcagtg tccccaatct tttggcatc aggaaccggg

301 ttcattggaag gcagtttttc cacagaagg gttggtgggt ggggtgatga ttcagtgat

361 aatgggaagg atggggaatg gtagatgcct gaggggttgg ggacctgtgc cctaagtcac

421 tgatgacagt aaggtcctgt ttcaatgcac acaatttata aagccttcca gaggtgact

481 gtcattcctt cttgcagcca gctcctcacc tcaggtgggg cagagagtaa ctgctccctt

541 tgcagttatc agaataaagc ccagggaata gaaggaaccc atccagggtc acacagctct

601 ttatgtcgac acccgggatg agaccctaac caatgcagaa ccttgtggga agcccttgcc

661 tctgctccca tggatcaacc tggatagttt taaagttttc ccactttcct gagctgtctg

721 ctccctgctg gcaaggtctg gggaccatga agctagtcag ttctgactgg caaatgggaa

781 agtgggttgg gaacacagac tcttccagag aaggtgggga gagcctgacc tcttgacag

841 ctcatgacca gcagttgagc ataaggcctg agggtaacat ggatactccc tgctccctaa

901 gccaaagccc aaccatacgg gcctcaaacc caccaggaag atcccaccta agagcctttg

961 tgattgtctg cctccacact ggaacattct ttctgttctg taatcatcca ggtttcatct

1021 cagtggtaaa gattccacct gcaatgcagg aaccacagga gatgcgggtt tgatccctgg

1081 gtctggaaga tcccctggag taatgcacag caaccattg cagtattctt gctggagaa

1141 tcccatggac agaggagcct ggacagaggg ctacagtcca tagcttgctt tctcagagag

1201 gtttcccttg accactttcc ctgaaatcac acacacccca ggtcccttga aagcctcatg

1261 atttttcttt ccctctagc acttactgct gtctgaagtt agttactttg tttcttgca

1321 gccttctcca taagaacatc agagagaggt ttccctcgtg gcccagtggt aaagaatccc

1381 ctggccaagt caggagacat ggggttcaatc cctgggtcca cactactggg agcatctaag

1441 ccgtgcacc cgtgtaacta cagaccctgt gctctagaat ctgggaacca cagctactga

1501 aacccaagca cctggagacc catgctctgc aacaagagaa gccacggcaa tgaaaacccg

1561 agcaccacag agagtagccc cccctctccg cagtagagaa agcccatgaa gaaacaaaga

1621 cccagcacag ccaaaaataa ataaatata acatttttta aaagatcatc agggaccttc

1681 tgtggctctc tctttaggct tgccagaaga gaacctgctt ctggttaagg ttaagggcac

1741 acagggttaa gtctaccac attgtctgga tgaagggtga cacacaggca cagactgggg

1801 ctcaactggg ttgggtggaa acaaaggctc agccccacta atccagctca gctcctaca

1861 tgtgacctcc gattttatgc agatcagaac ccgtctggct tctgttagcc tgagtcaccg

1921 tttctggaag tgggtctgac cacctccttg cagtgggcag cctgcgtgg gtatgtggga

1981 aggcaggctg gggctcctcc tctcaccctc cgcagggaat cgggtaggag ggagtggttc

2041 tgccctggga ggggtggtg gcccaggtgt ggctggctg tgccctcctc ctgtgtcgcc

2101 gctccgctg gagccagagc ctggaagacc ttggaggacc tcatcttcca ccatggcttt

2161 agtgaagctc cttttgcttc tatttttcca totgaaacat gagaagaaaa agtatttacc

2221 cagtgtcttc agactctgaa gagcaagctt caaggggaat gtcaagggca tggagctcct

2281 ggcctctctg agagacctgg ccacat

LOCUS DQ102853 529 bp DNA linear MAM 10-JUL-2006
DEFINITION Ovis aries interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene, exon 1s
and partial cds.
ACCESSION DQ102853
VERSION DQ102853.2 GI:110265151
KEYWORDS .
SOURCE Ovis aries (sheep)
ORGANISM [Ovis aries](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 529)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Goudarzy,K.,
Laurent,P., Bertaud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and
Serrano,M.
TITLE Location, partial characterization and differential expression of
two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in
sheep
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 529)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Alves,E., Gonzalez,C. and
Serrano,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-JUN-2005) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La
Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
REFERENCE 3 (bases 1 to 529)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Alves,E., Gonzalez,C.,
Goudarzy,K., Laurent,P. and Serrano,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-JUL-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La
Coruna Km 7.5, Madrid 28040, Spain
REMARK Sequence update by submitter
COMMENT On Jul 10, 2006 this sequence version replaced gi:[70673320](#).
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..529
/organism="Ovis aries"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[9940](#)"
[gene](#) <173..>529
/gene="IL1RN"
[mRNA](#) <420..>529
/gene="IL1RN"
[CDS](#) /product="interleukin 1 receptor antagonist"
420..>529
/gene="IL1RN"
/note="similar to Homo sapiens IL1RN mRNA variants 1-4"
/codon_start=1
/product="interleukin 1 receptor antagonist"
/protein_id="[AAZ06805.2](#)"
/db_xref="GI:110265152"
/translation="MDIYIHGYLICLLFLFHSETACHPLGKRPEMQAF"
[exon](#) 420..529
/gene="IL1RN"
/number=1s
ORIGIN
1 aaatggcctg agtctctgac gtgcactggg aacactgcc a cttggcttct tgcaagaggg
61 ggacatttct actcgcatth ggtttttcaa agcctcggga tacctgtcag gcagatgagg
121 ggcttgggtt ttcattgtgc ccttcttccc aggaactggg tgaaggggaa atagaaatct
181 caatttttgg gaaattgcac agagggaaaag gggagggaat gggttacgac atccatttgc
241 gacactcggc aggggttgaa gtgacaacag caagggttct cgttttggaa atgtgcaggc
301 gtttcggttc attttcgtgg gacaggcgcc cgcagcccgg ctgggtgagc cactcttttc
361 ttataagcg gtcctctctg gtccgaaatg gcagtctccc atgcgctcaa ggtcacagga
421 tggacatcta catccacggt tacctaattt gtctctctct ctctctgttc cattcagaaa
481 cagcctgcc a cccctggga aagagaccct gcgagatgca agccttcag

LOCUS DQ660409 1166 bp DNA linear MAM 01-AUG-2006
 DEFINITION Ovis aries interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene, exon 4 and partial cds.
 ACCESSION DQ660409
 VERSION DQ660409.1 GI:110084479
 KEYWORDS .
 SOURCE Ovis aries (sheep)
 ORGANISM [Ovis aries](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1166)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Goudarzy,K., Laurent,P., Bertoud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C., Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and Serrano,M.
 TITLE Location, partial characterization and differential expression of two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in sheep
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1166)
 AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Alves,E. and Serrano,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-MAY-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La Coruna, Km 7.5, Madrid 28040, Spain
 FEATURES
 source 1..1166
 /organism="Ovis aries"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:[9940](#)"
 [gene](#) <1..>1166
 /gene="IL1RN"
 [variation](#) 12
 /gene="IL1RN"
 /replace="t"
 [variation](#) 21
 /gene="IL1RN"
 /replace="t"
 [variation](#) 37..50
 /gene="IL1RN"
 /replace=""
 [mRNA](#) <1016..>1166
 /gene="IL1RN"
 /product="interleukin 1 receptor antagonist"
 [CDS](#) <1016..>1166
 /gene="IL1RN"
 /codon_start=1
 /product="interleukin 1 receptor antagonist"
 /protein_id="[ABG49397.1](#)"
 /db_xref="GI:110084480"
 /translation="AVNITDLNQNRQDKRFAFIRSDNGPTTSFESAACPGWFLCTSL
 EADQPV"
 [exon](#) 1016..>1166
 /gene="IL1RN"
 /number=4
 ORIGIN
 1 ttatgattct gggggttgac caggatcagc tgggtagatc tgtgccacac agatctaccg
 61 cagtcacatt cagcagggat cttagctggg gctcatcctc caggttctcc ttccacacgg
 121 tctcactgat ttcagttgtc agcttaagct tccttacagc atgacggttg gtttccaaga
 181 gggataactc caaaaaggca agccttagtg tgcaagcact tattaaactt ttgttcatat
 241 cataccatta ctgtccaatt aactagagct tgccatgtgg ctaagtctag cctcaatgag
 301 agaagggatt accaggatga ggacaccagg aggcttggtt tctctgggga cctcagtgtc
 361 tgtgtgtcac tctcttgccc aaggggccact aacctacttg gacttgccct cttccagtaa
 421 agccaacctt tgggaccatt ccttttcagc ccttatctac tcaaatccat gagatggcat
 481 cccctccagg gccttgtgct cctgtgcaac ttaaatgggc catcagccct ggaaaaagag
 541 agctttctat cagggcactg ttggacaaaa tcttaaccca aatgagaatg gctataattg
 601 tggcattgtc cttctgtgcc actagtgaac aggcacttta gtggaaaagt actgcctgct
 661 ttgtgtggag tagcaatgat cagatattgt gaataatgtg gactgctatg ccctgcccag
 721 ctgctgcact ctcccatctc tcagaggtgc agacacaaca gaatccagcc tccaaggcct
 781 tggcctctgt tgatggtacc gtgtgtttgc caaatgtatg gaccaaaggc tacagtggtc
 841 agatgtcccc aaatcaaggt gtaagcatgg gacaacctcc ttgtgtcagg ctgtcctgag
 901 accgaggaca cttttgccag gccagcattt ccccagcact tactctcaga tggccagggtg
 961 ggctgcgagg acctttctgc tcctotgccc tcaacttgctt cttcttgact tccaggctgt
 1021 gaacatcacc gacttgaacc aaaacaggga gcaggacaag cgcttcgcct tcatccgctc
 1081 tgacaatggc cccaccacca gcttcgagtc ggctgcctgc cccggctggg tcctctgcac
 1141 atcactggag gccgaccagc ccgtgg

LOCUS DQ660408 282 bp mRNA linear MAM 01-AUG-2006
DEFINITION *Ovis aries* interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) mRNA, partial
cds.
ACCESSION DQ660408
VERSION DQ660408.1 GI:110084477
KEYWORDS .
SOURCE *Ovis aries* (sheep)
ORGANISM [Ovis aries](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Caprinae; *Ovis*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 282)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Goudarzy,K.,
Laurent,P., Bertoud,M., Hayes,H., Beattie,A.E., Serrano,C.,
Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J. and
Serrano,M.
TITLE Location, partial characterization and differential expression of
two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in
sheep
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 282)
AUTHORS Marcos-Carcavilla,A., Calvo,J.H., Gonzalez,C., Serrano,C.,
Martin-Burriel,I., Lyahyai,J., Zaragoza,P., Badiola,J.J., Alves,E.
and Serrano,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-MAY-2006) Mejora Genetica Animal, INIA, Ctra. La
Coruna, Km 7.5, Madrid 28040, Spain
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..282
/organism="Ovis aries"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9940"
[gene](#) <1..>282
/gene="IL1RN"
[CDS](#) <1..>282
/gene="IL1RN"
/note="encoded by exon 1s through exon 4"
/codon_start=1
/product="interleukin 1 receptor antagonist"
/protein_id="ABG49396.1"
/db_xref="GI:110084478"
/translation="GKRPCEMQAFRIWDVNQKIFYLRNNQLVAGYLQEANIKLEEKID
VVPiEPHTMFLGIHGKGLCLACVKSDEIKLKLEAVNITDLNQNREQDKR"
ORIGIN
1 ggaaagagac cctgcgagat gcaagccttc aggatctggg atgtcaacca gaagatcttc
61 tacctgagga ataaccaact agttgctgga tacttgcaag aagcaaatat taaattagag
121 gagaagatag atgtggtacc catcgaacct catactatgt tcctggggat ccatgggggg
181 aagctgtgcc tggcctgcgt caaatctgga gatgagatca agctcaagtt agaggctgtg
241 aacatcaccg acttgaacca aaacaggagg caggacaagc gc



VIII.2. ARTÍCULO *IL1B* E *IL1RN*

Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Serrano C, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Alves E, Zaragoza P, Badiola JJ, Serrano M (2007a) **IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression.** Mamm Genome 18, 53-63

IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression

Ane Marcos-Carcavilla,¹ Jorge H. Calvo,² Carmen González,¹ Katayoun Moazami-Goudarzi,³ Pascal Laurent,³ Maud Bertaud,³ Hélène Hayes,³ Anne E. Beattie,⁴ Carmen Serrano,⁵ Jaber Lyahyai,⁵ Inmaculada Martín-Burriel,⁵ Estefânia Alves,¹ Pilar Zaragoza,⁵ Juan J. Badiola,⁶ Magdalena Serrano¹

¹Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra La Coruña Km 7.5, 28040, Madrid, Spain

²Unidad de Tecnología en Producción Animal, Avda. Montañana 930, CITA, 50059, Zaragoza, Spain

³Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Département de Génétique Animale, INRA, Centre de Recherche de Jouy, 78352, Jouy-en-Josas, Cedex, France

⁴AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand

⁵Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Server 177, 50013, Zaragoza, Spain

⁶Centro Nacional de Referencia de EETs, Universidad de Zaragoza, Miguel Server 177, 50013, Zaragoza, Spain

Received: 7 August 2006 / Accepted: 30 October 2006

Abstract

Scrapie (SC) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in sheep and goats. Susceptibility to this neurodegenerative disease is controlled mainly by point mutations at the *PRNP* locus. Other genes, apart from *PRNP*, have been reported to modulate resistance/susceptibility to SC. On the basis of several studies on Alzheimer's disease and different TSE models, and of requirement for correct homeostasis of cytokines in brain, *IL1B* and *IL1RN* were chosen as putative positional and functional candidate genes that might be involved in the polygenic variance mentioned above. In the present work, ovine *IL1B* and *IL1RN* genes were partially isolated and characterized, including promoter and other regulatory regions. In addition, several sequence polymorphisms were identified. Furthermore, their cytogenetic positions on sheep chromosomes were determined by FISH and confirmed by linkage analysis, localizing both genes in OAR3p22, a region previously described as carrying a QTL for SC incubation period in sheep. Finally, expression analyses were carried out in eight naturally SC-infected and five uninfected sheep with the same genotype for *PRNP* (ARQ/ARQ). This comparison was performed using real-time RT-PCR in samples of spleen and

cerebellum. Results showed differences in the expression of both cytokines in cerebellum ($p < 0.05$) but not in spleen ($p > 0.05$).

Introduction

Scrapie (SC) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of sheep and goats. TSEs are neurodegenerative diseases caused by transmissible proteinaceous particles (prions) devoid of nucleic acid that affect man and various animals (Prusiner 1998). These neurodegenerative disorders are accompanied by an atypical inflammatory response characterized by microglial activation (Betmouni et al. 1996). It is not known whether this response contributes to the pathogenesis, although it has been shown that microglial activation follows plaque formation and precedes vacuolation and cell death (Williams et al. 1997).

Although susceptibility to this neurodegenerative disease is controlled mainly by point mutations at the *PRNP* locus (Prusiner 1991), significant differences in the incubation period for SC have been reported in mice with the same genotype for *PRNP* (Carlson et al. 1988; Dickinson 1975; Westaway et al. 1987). In a flock of Romanov sheep affected by natural SC, Diaz et al. (2005) have demonstrated the existence of a polygenic variance, independent from *PRNP* mutations and involved in the modulation of

Correspondence to: Ane Marcos-Carcavilla; E-mail: amarcos@inia.es

the response to SC. Evidence for other genomic regions containing genes that influence the incubation period for SC and other TSEs in sheep and mice have been reported (Lloyd et al. 2001, 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003a, b; Stephenson et al. 2000). Thus, a reasonable hypothesis is that a major gene (*PRNP*) controlling resistance/susceptibility to SC coexists with a number of genes (polygen) that modulate its effect.

The interleukin-1 (IL-1) family consists of three structurally related polypeptides that exert their functions by interacting with specific receptors (IL1R1 and IL1R2) in the cell membrane. The first two are interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-1 β (IL-1 β), two agonists that have a broad spectrum of both beneficial and harmful biological actions. The third one is an antagonist that inhibits the activity of IL-1 (IL-1 receptor antagonist IL-1Ra). The term IL-1Ra refers to two distinct isoforms in man and mouse: secreted IL-1Ra (sIL-1Ra) and intracellular IL-1Ra (icIL-1Ra). Both isoforms are derived from the same gene and are generated by alternative splicing of different forms of the first exon. IL-1 can be overexpressed by central nervous system macrophage-equivalent cells, the microglia, in response to local brain injury insults, or under certain conditions involving repeated or persistent injurious stimuli. Various prionic and nonprionic neurodegenerative diseases are examples of such sustained, chronic overexpression of IL-1 (Baker and Manuelidis 2003; Brown et al. 2003; Mogi et al. 1994; Mrak and Griffin 2001; Vitkovic et al. 1994, 2000; Xiang et al. 2004). Moreover, several studies have demonstrated a positive association between inheritance of specific polymorphisms at regulatory regions in *IL1B* and *IL1RN* loci (coding IL-1 β and IL-1Ra, respectively) and an increased risk for Alzheimer's disease (Licastro et al. 2004; Sciacca et al. 2003) and other neurodegenerative disorders (McGeer et al. 2002). Glial overexpression of IL-1 α and IL-1 β has been reported in murine SC models during preclinical and clinical stages of the disease (Brown et al. 2003; Campbell et al. 1994; Kim et al. 1999; Williams et al. 1997), and higher resistance against SC pathogenesis has been shown in IL-1RI knockout mice (Schultz et al. 2004). These findings prompted us to study *IL1B* and *IL1RN* as possible candidate genes contributing to ovine SC.

The first objective of this work was to determine the cytogenetic position of *IL1B* and *IL1RN* on ovine chromosomes. The next step was to verify if there was any difference in the expression of these genes between SC-infected and uninfected sheep presenting the same genotype for *PRNP* (ARQ/ARQ). This comparison was performed in samples of spleen and

cerebellum tissues. These are important organs in the development of SC and other TSEs because, after oral infection, prions replicate in the spleen and subsequently migrate to the central nervous system causing a profound neurodegeneration. Finally, as expression differences between SC-infected and uninfected sheep were shown, we decided to search for polymorphisms in the regulatory regions of these genes. With this purpose we used a group of animals that, in spite of being in contact with the disease, presented different responses to it.

Material and methods

Isolation of sheep-specific DNA fragments. Genomic DNA was extracted from ovine lymphocytes according to the salting-out procedure protocol described by Miller et al. (1988). Bacterial artificial chromosome (BAC) DNA was purified by a maxi-preparation with the Nucleobond PC 100 Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

To obtain *IL1B* sequences, 16 primers were synthesized (Table 1). Twelve of these 16 primers were ovine-specific and designed from the sheep *IL1B* mRNA sequence (GenBank X54796.1). The other four were heterologous primers designed from human (GenBank U26540, NM_0163717, and NM_004487), murine (GenBank XM_287273 and NT_039238), and bovine (GenBank NW620243 and XM_215605) sequences. To isolate *IL1RN* fragments, ten heterologous primers from human (GenBank AC024704, M97748, and X77090.1) and bovine (GenBank NW_205428 and NW_174357) sequences, and three specific primers based on the sequence of the ovine fragments previously isolated with the primers described above, were synthesized (Table 1). *IL1RN* regulatory regions were inferred by sequencing both the BAC DNA insert and PCR-amplified fragments from the BAC. Genomic (60–100 ng) and BAC (100 ng) DNA were amplified in a final volume of 25 μ l containing 0.5 μ M of each primer, 200 μ M of dNTPs, 1.5–2 mM MgCl₂, 2.5 μ l of 10 \times buffer MgCl₂ free (Biotools), and 1U Taq polymerase (Biotools). The following PCR conditions were used: denaturation at 94°C for 5 min, 30 amplification cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, annealing temperature between 50°C and 67°C for 30 sec, and extension at 72°C for from 30 sec to 1min 30 sec, followed by a final 5-10-min extension at 72°C. Primers pairs and their amplification conditions are shown in Table 1. The resulting PCR fragments were purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) and bidirectionally sequenced with the PCR primers.

Table 1. List of primers used to amplify *IL1B* and *IL1RN* genes

Gene	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size	Ta	Ext. time	MgCl ₂
<i>IL1B</i>						
Enhancer	5'-TTGGGGACCGGAAGGAAGTGCT-3'	5'-CTGGGACTTGAGATAGAGG-3'	300 pb	55°C	45	2 mM
Promotor-Exon2	5'-TACCAASAGATAGTCTCAG-3'	5'-CTGTAGCAAGCCATCACTTCATT-3'	1650 pb	61°C	1 min 45s	2 mM
Intron1-Intron2	5'-ATTGGCTAGRTAMCAGCACCCTGGTC-3'	5'-CTGTAGCAAGCCATCACTTCATT-3'	1300 pb	61°C	1 min 30s	1,5 mM
Exon2-Exon3	5'-TTACTCTGAACCCAAAGGATGAT-3'	5'-AGTATCCCTGTGTCTGAG-3'	600 pb	61°C	1 min	2 mM
Intron2-Intron3	5'-AAC CGT ACC TGA ACC CAT CAA TGA-3'	5'-CATCTGTAGGGCCATCAACCTC-3'	600 pb	51°C	1 min	2 mM
Exon3-Exon4	5'-GCAGGAGGCGCAGACAGAT-3'	5'-ATCACCAAGCTCAGCGAAACACT-3'	500 pb	64°C	1 min	2 mM
Exon4-Exon5	5'-GCAGGAGGCGCAGACAGAT-3'	5'-GAACAAGCCGCCAGAACACT-3'	400 pb	66°C	1 min	2 mM
<i>IL1RN</i>						
Promotor ic	5'-ATGAGCTGTTATTGAGGTGATG-3'	5'-TCGAAGATGAATGAAAGGATGC-3'	2000 pb	64°C	2 min	1,5 mM
Promotor ic	5'-AGCTGCACCCAACACCTG-3'	5'-CTTCTCGGCTCATTTCTCTG-3'	700 pb	67°C	1 min	2 mM
Promotor ic	5'-GGAAGTCCCTGCGGTCTGG-3'	5'-GCCAGCAGGGGAGCAGACA-3'	1300 pb	57°C	1 min 30s	2 mM
Promotor ic	5'-GCCCAGGGAATAGAGGAAC-3'	5'-CAGCTTCCAGAACGGTGACT-3'				
Promotor ic	5'-TGACCTCGGATTTATGCAGAT-3'	5'-AGTCCATGCCCTTGACA-3'				
Promotor-Exon1s	5'-GTTCCAGGTCACACAGGTG-3'	5'-CTTACCTGAAGGCTTGATC-3'	350 pb	54°C	30 s	2 mM
Promotor-Exon1s	5'-TGAAGGGGAAATAGAAATC-3'	5'-CTTACCTGAAGGCTTGATC-3'	200 pb	50°C	30 s	2 mM
Intron 3	5'-ATGATTCGKGGGTGACACAGGAT-3'	5'-GGCTTGCCCTTTGGAGTTATC-3'	1250 pb	62°C	1 min 30 s	2 mM
Intron3-Exon4	5'-ATGATTCGKGGGTGACACAGGAT-3'	5'-TCCTCTGGAAGTAGAAYTTGGTGA-3'				

Primers used to work with BAC DNA are shown in italics. Primers given without PCR conditions were used to sequence the DNA fragment directly from the BAC.

The identity of the fragments was confirmed by BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Polymorphism detection. Genomic DNA from five domestic sheep breeds (Latxa, Manchega, Awassi, Assaf, and Rasa Aragonesa) was amplified and sequenced as previously described and analyzed using CHROMAS 1.43 and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) software to detect polymorphisms along the isolated sequences of *IL1B* and *IL1RN*. Thus, to perform the genetic mapping five animals (one from each domestic breed) were analyzed without taking into account either their *PRNP* genotype or their pattern of scrapie resistance/susceptibility. The use of animals from different breeds had the aim of avoiding the possibility of any allele fixation due to the selective status of these breeds in our country (Spain) and of finding a representative polymorphism at the species level. On the other hand, it has been shown in previous studies of other neurodegenerative models (Licastro et al, 2004; Sciacca et al. 2003; McGeer et al. 2002) that mutations at regulatory regions might account for differential expression within individuals in different conditions (health/infected). Thus, 11 sheep from Rasa Aragonesa breed, with the same genotype for *PRNP* (ARQ/ARQ) and pertaining to flocks where SC had been detected (infected $n = 6$ and uninfected $n = 5$), were compared to identify polymorphism at these regions.

Chromosomal localization. Ovine *IL1B* and *IL1RN* genes were localized in the ovine genome by two approaches: cytogenetic and genetic mapping.

Primers located in *IL1B* introns 2 and 3 and *IL1RN* intron 3 (Table 1) were used to screen the ovine BAC library (Vaiman et al. 1999) at INRA-CRJ (Jouy-en Josas, France). DNA from the identified BAC clones was labeled by nick translation in the presence of biotin-14-dATP (BioNick TM 18247-015 labeling system) and used as probes for *in situ* hybridization on RBP-banded ovine chromosome preparations following the protocol described by Hayes et al. (1992).

Cytogenetic localizations were confirmed by linkage mapping. Both genes were mapped against markers on the sheep framework map (Maddox et al. 2001). Multipoint linkage analysis of the International Mapping Flock (IMF) pedigrees (Crawford et al. 1995) using the CRI-MAP program (Lander and Green 1987) was performed. To follow the gene's distribution within the pedigrees, two polymorphisms found by comparing the five sheep of the different breeds mentioned above were used: the

Table 2. List of primers and probes used for real-time RT-PCR

Gene	Primer and probes sequences	concentration	Size
<i>IL1B</i>	F: 5' TGAGGTTGATGGCCCTAAACA 3'	300 nM	
	R: 5' GGCCACGATGACCGACACT 3'	300 nM	142 pb
<i>IL1RN</i>	F: 5' CCTGGCCTGCGTCAAATCT 3'	300 nM	
	R: 5' GCCATTGTCAGAGCGGATGA 3'	300 nM	121 pb
<i>G6PDH</i>	F: 5' TGACCTATGGCAACCGATACAA 3'	300 nM	
(García-crespo et al. 2005)	R: 5' CCGCAAAAGACATCCAGGAT 3'	300 nM	76 pb
<i>SDHA</i>	F: 5' CATCCACTACATGACGGAGCA 3'	300 nM	
(García-crespo et al. 2005)	R: 5' ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA 3'	300 nM	90 pb
<i>18S rRNA</i>	F: 5' GGAATCAGGGTTTCGATTCC 3'	900 nM	
(Lyahyai et al. 2006)	R: 5' GGGTCGGGAGTGCGTAATTT 3'	900 nM	
	P: FAM- TCCAAGGAAGGCAGCAGGCC-TAMRA	150 nM	93 pb
<i>GAPDH</i>	F: 5' TCCATGACCACTTTGGCATCGT 3'	300 nM	
(Lyahyai et al. 2006)	R: 5' GTCTTCTGGGTGCGAGTGA 3'	300 nM	
	P: FAM- AGGGACTTATGACCACTGTCCACGCC-TAMRA	150 nM	70 pb

SNP (A/G) in *IL1B* intron 1 and a 14-bp insertion/deletion in *IL1RN* intron 6. The SNP was analyzed by PCR-RFLP using primers that hybridized *IL1B* introns 1 and 2 (Table 1). The reaction product (10 μ l) was digested with 1 U of BslI at 55°C over 12 h in a final volume of 15 μ l. The insertion/deletion polymorphism was analyzed by simple electrophoresis in a 4% agarose gel after amplification with primers located in *IL1RN* intron 6 (Table 1). In both cases, amplification conditions were as previously described.

Gene expression. Tissue samples were obtained from eight naturally SC-infected and five control sheep from the Rasa Aragonesa breed, different from those used to perform the polymorphism search, with the same sex, age, and *PRNP* genotype (ARQ/ARQ). SC animals belong to a flock of sheep, conserved for research purposes by the Spanish National Reference Centre for TSEs and where several scrapie cases have appeared in the last five years. Control animals were selected from a different flock where no scrapie had been reported to date. Small fragments of spleen and cerebellum were included in RNeasy lysis buffer (Qiagen). Total mRNA was purified from spleen and cerebellum with the RNeasy Mini Kit and the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), respectively. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of each RNA preparation using random hexamer primers with the SuperScript First-Stranded Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Gene expression levels were subsequently determined by real-time RT-PCR. Two tissue-specific housekeeping genes were used to normalize each set of results. Data from the spleen were normalized for succinate dehydrogenase complex subunit A (*SDHA*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA. Hexose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) and *18S rRNA*

mRNA were used in the case of cerebellum. Primers and probes used for gene expression analysis, their concentrations, and amplicon sizes are shown in Table 2. Amplification was carried out in a final volume of 25 μ l containing SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) or TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems), depending on the gene analyzed (Table 2). After preheating the mix at 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 30 sec were performed.

In the case of *IL1RN*, it was necessary to sequence a fragment of the cDNA containing part of exon 1 through exon 4 to synthesize a pair of primers adequate to carry out the real-time RT-PCR. These primers were F: 5'-GGAAAGAGACCCCTGCGAGATG-3' and R: 5'-CGCTTGCTCCTGCTCCCTGTT-3'. Because they are derived from regions common to *icIL1RN* and *sIL1RN*, no discrimination between the two forms was made. Amplification conditions were those described in the first subsection of *Materials and methods*. The annealing temperature was 61°C, the extension time was 30 sec, and $MgCl_2$ concentration was 2mM.

The normalization factor (NF) (Vandesompele et al. 2002) was calculated as the geometric mean of the quantity (Q) of the two housekeeping genes of each tissue (*SDHA* and *GAPDH* for spleen and *G6PDH* and *18S rRNA* for cerebellum). The normalized expression level of *IL1B* and *IL1RN* mRNA (*nIL1B* and *nIL1RN*, respectively) was calculated as the ratio between the Q values of *IL1B* and *IL1RN* and the NF calculated for each sample. Later, these ratios (*QIL1B*/NF and *QIL1RN*/NF) were transformed according to the expression arc sin $\sqrt{(nIL1B \text{ or } nIL1RN \times 100^{-1})}$ as recommended for parametric tests on relative data. Finally, a T-test was run to compare the means of the two samples. The test was constructed to determine whether the differences

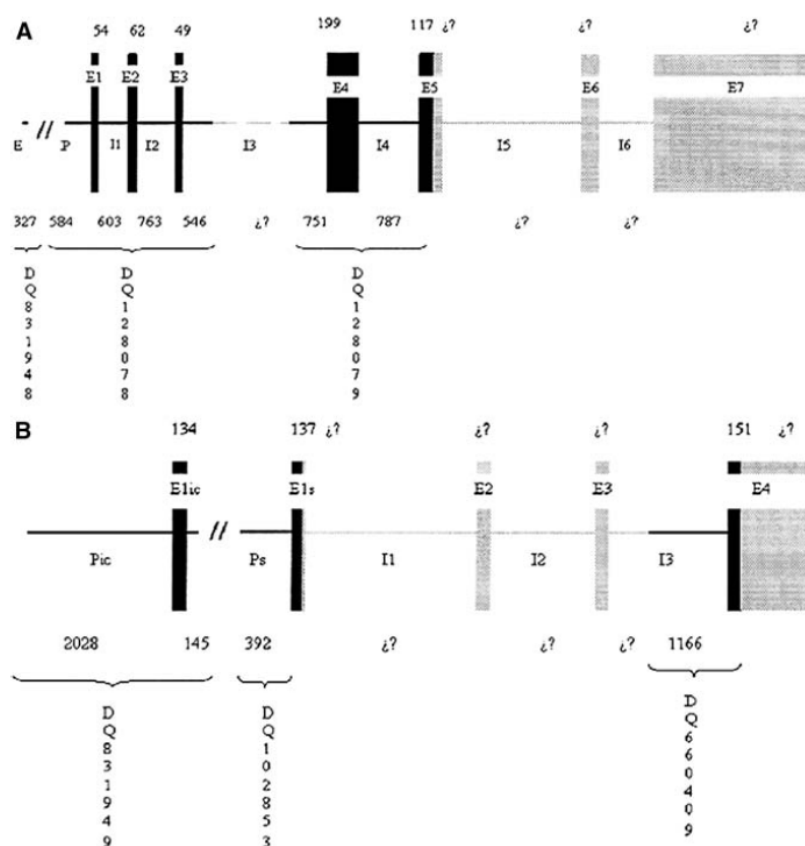


Fig. 1. Genetic structure of ovine *IL1B* (A) and *IL1RN* (B). Partial sequences isolated in the present work are represented in black. The structure of the genes that have not been isolated but organization of which is supposed to be conserved among species is represented in grey. Numbers above and behind enhancers (E), promoter (P), exons (E), and introns (I) represent the number of base pairs that have been isolated; when the fragment is unknown it is indicated by ϵ ?. The accession numbers are also shown.

between the means of expression data from naturally infected and control animals were equal to zero.

Results

Partial isolation of ovine *IL1B* gene and polymorphism detection. A primer pair designed from comparative sequence data between human and bovine *IL1B* sequences allowed us to isolate a 327-bp fragment (DQ831948) corresponding to an enhancer region previously described in man. Two other sequences, 2661 bp (DQ128078) and 1854 bp (DQ128079), were obtained using ovine-specific primers. The 2661-bp sequence contains a 584-bp fragment upstream of the transcription start site that includes various regulatory elements and the promoter region, exon 1, intron 1 (also important in the gene regulation), exon 2, intron 2, exon 3, and 546 bp of intron 3. The 1854-bp sequence includes 750 bp of intron 3, exon 4, intron 4, and 117 bp of exon 5. Exons

were identified according to homology with ovine and human mRNA sequences (X54796.1 and NM_000576, respectively), following the splicing rules described by Breathnach and Chambon (1981) and representing five of the seven exons (1-5) and four of the six introns (1-4) that constitute the whole *IL1B* gene. The precise length and full sequence of exons and introns were determined (Fig. 1a and GenBank accession numbers DQ128078 and DQ128079).

Thirty polymorphisms (29 SNPs and 1 insertion/deletion) were identified within the isolated fragments (see DQ128078 and DQ128079). Although two of these were located in exons 1 and 3, none of them produced any variants in the amino acid sequence.

Characterization of ovine *IL1B* regulatory regions. The regulatory sequences necessary to regulate *IL1B* gene expression in different situations and cell types represent a complex network. Several



Fig. 2. Polymorphisms and *cis*-acting elements localized within ovine *IL1B* (a, b) and *IL1RN* (c, d) regulatory regions. These polymorphisms were identified by comparing 11 sheep from the Rasa Aragonesa breed with ARQ/ARQ genotype for PRNP. (a) Nucleotide sequence of ovine *IL1B* enhancer (DQ831948). Bold and underlined sequences contain binding sites for STAT-like factor (ttcctgaga), NF β 1 (gtttcacttcc), NF β 2 (gagatgg), CRE/AP-1 (ctacgtca), and NF- κ B (ggggcattgccc). (b) Nucleotide sequence of ovine *IL1B* containing several regulatory elements and the promoter (DQ128078). Bold and underlined sequences represent previously described *cis*-acting elements: Oct-1 (atttga), NF-IL6 (ggttgtaaatcag), Spi-NF- β A (cacttctgctt), the putative TATA box (cctataaaa), AP-1 (ctgactagg), and C/EBP (cttgcaaaa). Transcription factor binding sites predicted with the TFSEARCH program are highlighted in black: CdxA (cagaaa/g, cc/ttctg, aata/tata) and SRY (aa/gacagc), IRF-2 (actgtcacta/ttcc), NF-kap or c-Rel (ggaaaaccca/t), c/EBP (taacttgcaaaata/t), deltaE (atcca/gcctgca), USF (cca/gcctgc), and MZF1 (atagggga/g, catgga/gga). (c) *IL1RN* 5' flanking sequence (DQ831949). The pyrimidine-rich sequence is underlined; highlighted in black are the putative binding sites for AP-1 (cctgagtcacc), SP-1 (tgactca), and CK-1 like factors (tggaagctg) found with the TFSEARCH program. (d) *sIL1RN* promoter containing two possible c/EBP binding sites (ccattgcgacactc and gttttggaat) and a TATA box (tataag). Exons are in capital letters and ATG in bold represents the translation start site. Numbers are the nucleotide positions as they appear in GenBank.

cis-acting elements involved in the regulation of the *IL1B* gene expression have been determined in human and bovine species (Bensi et al. 1990; Hunninghake et al. 1992; Kominato et al. 1995; Shirakawa et al. 1993; Tseng et al. 1998; Tsukada et al. 1994, 1996). Most of these elements have also been recognized in the ovine gene (Fig. 2). In this

way, within the 327 bp that constitute part of the enhancer region of the *IL1B* gene, we identified binding sites for *trans*-acting elements such as STAT-like factor, NF- β 1, NF- β 2, CRE/AP-1, and NF- κ B. Moreover, within the 2661-bp (DQ128078) sequence, we found promoter-proximal regulatory elements containing binding sites for Oct-1 that

mediate the autocrine regulation of IL-1 β , NF-IL6, and B-cell and myeloid-specific transcription factors Spi-1/NF- β A. Despite punctual variations, the consensus TATA sequence is evolutionarily conserved in this gene. However, its functionality has been questioned (Kominato et al. 1995). The AP-1 and C/EBP sites described in bovine intron 1 were also identified in the ovine gene. The aforementioned elements have zero or, at most, a single mismatch with consensus sequences previously described in man and cattle. Nevertheless, other sites, despite having several mismatches, may be equally functional. It should be mentioned that 13 polymorphisms were detected in the regulatory interval, including the 5' flanking region through intron 1 of the DQ128078 sequence by comparing the 11 sheep from the Rasa Aragonesa breed described above (Fig. 2). Although none of these variations affects the *cis*-regulatory elements previously described, nine of them are located within several regulatory sequences predicted with the program TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), including putative binding sites for CdxA, SRY, IRF-2, NF- κ B, c-Rel, c/EBP, deltaE, USF, and MZF1, *trans*-acting factors.

Partial isolation of the ovine IL1RN gene and polymorphism detection. Using heterologous primers based on bovine and human sequences, three fragments of 2307 (DQ831949), 529 (DQ102853), and 1166 bp (DQ660409) were isolated from BAC and genomic DNA. They correspond to the 5' flanking region plus the first exon of the two IL1-Ra variants and to the common intron 3 and exon 4, respectively. The precise length and full sequence of exons and introns were determined according to sequence homologies with known *IL1RN* sequences of man (NM_173841), mouse (DQ282808), and cattle (NW_205428 and NM_174357). The organization of the ovine and bovine *IL1RN* genes are identical, with the coding region divided into five exons (two possible versions of exons 1 depending on the variant and three common exons, 2-4) according to the splicing rules described by Breathnach and Chambon (1981) (Fig. 1 and GenBank accession numbers DQ831949, DQ102853, and DQ660409). In addition, based on DQ102853 and DQ660409 sequences, another primer pair was synthesized to amplify the coding region corresponding to part of the *IL1RN* cDNA (DQ660408). DQ660408 is a 282-bp sequence that includes the common coding regions of intracellular and secreted forms: common part of exon 1 and exons 2, 3, and part of exon 4. Two SNPs and a deletion of 14 bp were identified within the 1166-bp fragment (see DQ660409).

Characterization of ovine IL1RN regulatory regions. Various regulatory elements are located within the 5' flanking region at different positions of the human *IL1RN* gene coding for the intracellular form: -4525 to -1438, -1438 to -909, -288 to -156, and -156 to -49 (Jenkins et al. 1997). Several *cis*-regulatory elements proposed within this region (Butcher et al. 1994) were also located within the ovine promoter (Fig. 2). Thus, we confirmed the absence of a TATA-like motif in the vicinity of the transcription start site and confirmed the presence of an 18-bp pyrimidine-rich sequence instead. Moreover, potential binding sites for AP-1, CK1, and SP-1 were identified. The program TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) identified many additional putative *cis* elements.

Similarly, Smith et al. (1992, 1994) demonstrated the existence of both inductive and inhibitory *cis* elements within the proximal 294-bp end of *IL1RN* controlling the activation of sIL-1ra promoter in man. Despite the absence of conclusive reports describing the elements contained in this region, it was possible to find various consensus sequences that could represent binding sites for different *trans*-acting elements (Fig. 2). We used the programs SignalScan (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/signal/>) and TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) and found that along the 300 bp upstream of the translation start site there are two possible C/EBP sites at -186 and -138 bp of the translation start site, and a TATA box at -58 bp from the DQ102853 sequence.

Chromosomal localization of ovine IL1B and IL1RN genes. Ovine *IL1B* and *IL1RN* genes were mapped to OAR3p22 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). These results were confirmed by linkage mapping. The best supported linkage map of the relevant region of Chromosome 3 that includes the *IL1B* and *IL1RN* markers, obtained by CRI-MAP multipoint analysis, is shown in Fig. 3. *IL1B* and *IL1RN* mapped together (recombination fraction $r = 0$), with their best position between *IL1A* and *LSCV44*. *IL1B* was located between *IL1A* ($r = 0.04$, two-point LOD score = 8.44) and *LSCV44* ($r = 0.05$, two-point LOD score = 16.06) markers. *IL1RN* was located between *IL1A* ($r = 0.02$, two-point LOD score = 12.34) and *LSCV44* ($r = 0.04$, two-point LOD score = 22.08) markers.

Gene expression analyses. The expression of these two IL-1 family members was studied by real-time RT-PCR in spleen and cerebellum tissues. No significant difference in the expression of *IL1B* and *IL1RN* between affected and healthy animals was

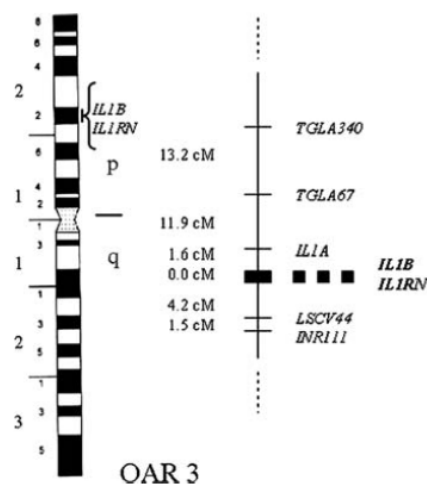


Fig. 3. Cytogenetic (left) and genetic (right) maps with the positions of *IL1B* and *IL1RN* genes on sheep Chromosome 3.

found in the spleen ($p > 0.05$). Conversely, a significant increase ($p < 0.05$) of mRNA concentration was observed in the cerebellum of SC-infected sheep for *IL1B* ($t = -2.48$) and *IL1RN* ($t = -2.60$) (Fig. 4).

Discussion

We have sequenced 4840 bp of the ovine *IL1B* gene. The five exons of the genomic sequence analyzed

here encode 137 of the 266 amino acids that constitute the complete protein. The first 114 amino acids constitute the signal peptide. The partial coding region isolated here shows homologies with other ovine *IL1B* sequences deposited at GenBank that vary from 98% to 100%. This corresponds to 3% of variability at the amino acid level within the ovine IL-1 β .

Similarly, 4002 bp of the ovine *IL1RN* gene were isolated. Clustal W analysis revealed that the two 5' flanking regions of *IL1RN* are quite conserved among man, cattle, and sheep. This could indicate the presence of conserved regulatory elements. Nevertheless, further studies will be necessary to identify more precisely *cis*-acting regulatory sequences responsible for basal and stimulated iCL-1ra and sIL-1ra production in different cell types and to characterize the regulatory proteins involved. The four exons contained in the sequenced cDNA fragment encode 88 amino acids common to iCL-1ra and sIL-1ra. The signal peptide of sIL-1ra is not represented here; however, it is encoded in the exon 1s contained in the isolated sequence DQ102853. Thus, by joining these two sequences it was possible to reconstruct the first 120 amino acids of the sIL-1ra.

Our results show that in sheep, as in man, *IL1B* and *IL1RN* are highly polymorphic genes, encompassing both SNPs and length variants (VNTR).

The localization of ovine *IL1B* and *IL1RN* genes on OAR3p22 is consistent with comparative mapping information because both genes map to bovine Chromosome 11, human Chromosome 2, and mouse Chromosome 2. It should be noted that ovine Chromosome 3 and mouse Chromosome 2 have already been reported as chromosomes containing QTL regions involved in resistance/susceptibility and incubation period to SC and other TSEs (Lloyd et al. 2001, 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003a, b) and that these genes are located within the proposed intervals. The present data uphold the hypothesis that *IL1B* and *IL1RN* are positional candidate genes to SC in sheep.

Expression results are in concordance with several reports revealing an altered proinflammatory cytokines profile associated with nervous tissues but not with spleen and other peripheral organs during SC infection (Cunningham et al. 2005; Campbell et al. 1994). Previous studies revealed that high prion titers in lymphoid organs were not accompanied by significant histopathologic changes (Clarke and Haig 1971; Dickinson et al. 1972). In addition, the spatial distribution of activated microglia has been demonstrated to be more correlated with areas of synaptic (Cunningham et al. 2003) and vacuolar (Williams et al. 1994a, b) degeneration than with regions of

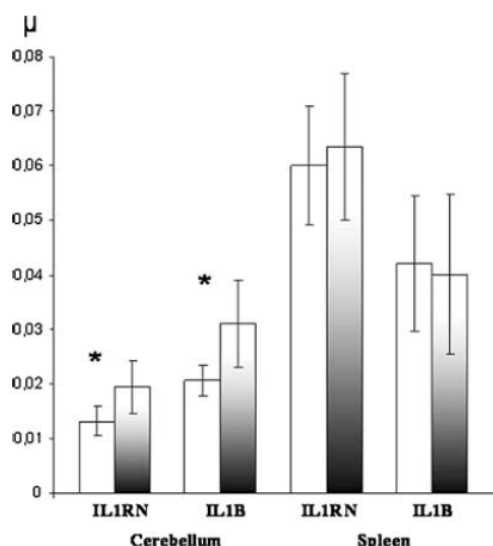


Fig. 4. *IL1RN* (left) and *IL1B* (right) mRNA relative expression level (arbitrary units) in cerebellum of control (white) and scrapie-infected (black/gray) sheep. The mean (μ) and the standard deviation (bars) for normalized data ($\text{arc sin}\sqrt{nIL1RN}$ or $nIL1B \times 100^{-1}$) are shown. * indicates significant differences ($p < 0.05$) of mRNA concentration between affected and healthy animals.

Prp^{sc} accumulation. Thus, it seems that cytokine overexpression is, unless in primary instance, the consequence rather than the cause of cellular damage. Thus, the increased levels of *IL1B* and *IL1RN* mRNA observed in the cerebellum of SC-infected sheep can be explained as a consequence of the neurodegeneration associated with the disease.

IL-1Ra modulates IL-1 β bioactivity by intercepting the IL-1 autoamplification loop (Vamvakopoulos et al. 2002). In healthy human populations the IL-1Ra/IL-1 β ratio is approximately 1. In the animal populations studied in this work, the *IL1RN/IL1B* mRNA ratio was independent of the infection status ($p > 0.05$), indicating that IL-1 β activity was being buffered by IL-1Ra. However, we cannot rule out the implication of these cytokines in the variable response to SC observed in mice and sheep with the same genotype for *PRNP*. Genetic polymorphism is an acknowledged source of phenotypic variation. It contributes to the wide interindividual variation in stimulated IL-1 β and IL-1Ra production observed in humans (Danis et al. 1995; Endres et al. 1983). *IL1RN* genotype alone explains 5% of the observed interindividual variation in IL-1 β plasma levels. Moreover, there is mounting evidence that some of these polymorphisms may constitute risk factors for a growing number of human diseases (Blakemore et al. 1994, 1995; Carter et al. 2001; El-Omar et al. 2000; Keen et al. 1998; Perrier et al. 1998). In this way any polymorphism at *IL1B* and/or *IL1RN* loci modifying the activity of IL-1 β could affect the progression of cellular damage in the brain of SC-infected animals if the cytokine cycle is altered. This is why we decided to perform a preliminary polymorphism search by comparing the regulatory regions of these genes between sheep that, despite being exposed to the infection, present different responses.

It can be concluded that *IL1B* and *IL1RN* are good positional and functional candidate genes that modulate the SC incubation period in sheep. Thus, any cause leading to an up- or downregulation of IL-1 β activity could influence the onset of the clinical stage of the disease by interfering with the neurodegeneration process. We have provided several polymorphisms at *IL1B* and *IL1RN* loci that might be useful to assess linkage to SC resistance/susceptibility and/or the incubation period in the future.

Acknowledgments

The authors thank the CERSYRA-Valdepeñas and AGRAMA breeders associations, CSIC-León, CITA-Aragón, and INIA-Madrid for kindly providing the Manchega, Awassi, Assaf, Rasa Aragonesa, and

Mouflon samples. They are also very grateful to Dr. E.P. Cribiu for allowing them to perform the cytogenetic mapping in his laboratory and to Dr. K.G. Dodds for his suggestions and editing of the manuscript for English grammar.

References

1. Baker CA, Manuelidis L (2003) Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 675–679
2. Bensi G, Mora M, Raugei G, Buonomassa DT, Rossini M, et al. (1990) An inducible enhancer controls the expression of the human interleukin 1 beta gene. *Cell Growth Differ* 1, 491–497
3. Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74, 1–5
4. Blakemore AI, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, et al. (1994) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37, 1380–1385
5. Blakemore AI, Watson PF, Weetman AP, Duff GW (1995) Association of Graves' disease with an allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 111–115
6. Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50, 349–383
7. Brown AR, Webb J, Rebus S, Walker R, Williams A, et al. (2003) Inducible cytokine gene expression in the brain in the ME7/CV mouse model of scrapie is highly restricted, is at a strikingly low level relative to the degree of gliosis and occurs only late in disease. *J Gen Virol* 84, 2605–2611
8. Butcher C, Steinkasserer A, Tejura S, Lennard A (1994) Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 153, 701–711
9. Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV (1994) Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 68, 2383–2387
10. Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, et al. (1988) Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol* 8, 5528–5540
11. Carter MJ, di Giovine FS, Jones S, Mee J, Camp NJ, et al. (2001) Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. *Gut* 48: 461–467
12. Clarke MC, Haig DA (1971) Multiplication of scrapie agent in mouse spleen. *Res Vet Sci* 12, 195–197
13. Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, et al. (1995) An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140, 703–724
14. Cunningham C, Deacon R, Wells H, Boche D, Waters S, et al. (2003) Synaptic changes characterize early

- behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *Eur J Neurosci* 17, 2147–2155
15. Cunningham C, Wilcockson DC, Boche D, Perry VH (2005) Comparison of inflammatory and acute-phase responses in the brain and peripheral organs of the ME7 model of prion disease. *J Virol* 79, 5174–5184
 16. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D (1995) Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 99, 303–310
 17. Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM (2005) Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol* 86, 849–857
 18. Dickinson AG (1975) Host-pathogen interactions in scrapie. *Genetics* 79 Suppl, 387–395
 19. Dickinson AG, Fraser H, Meikle VM, Outram GW (1972) Competition between different scrapie agents in mice. *Nat New Biol* 237, 244–245
 20. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, et al. (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398–402
 21. Endres S, Cannon JG, Ghorbani R, Dempsey RA, Sisson SD, et al. (1989) In vitro production of IL 1 beta, IL 1 alpha, TNF and IL2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. *Eur J Immunol* 19, 2327–2333
 22. Garcia-Crespo D, Juste R, Hurtado A (2005) Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet Res* 1, 3
 23. Hayes H, Petit E, Dutrillaux B (1991) Comparison of RBG-banded karyotypes of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet* 57, 51–55
 24. Hunninghake GW, Monks BG, Geist LJ, Monick MM, Monroy MA, et al. (1992) The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein transactivation. *Mol Cell Biol* 12, 3439–3448
 25. Jenkins J, Drong R, Shuck M, Bienkowski M, Slightom J, et al. (1997) Intracellular IL-1 receptor antagonist promoter: cell type-specific and inducible regulatory regions. *J Immunol* 158, 748–755
 26. Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, Spector TD (1998) Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone* 23, 367–371
 27. Kim JJ, Ju WK, Choi JH, Choi E, Carp RI, et al. (1999) Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res Mol Brain Res* 73, 17–27
 28. Kominato Y, Galson D, Waterman W, Webb A, Auron P (1995) Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol* 15, 59–68
 29. Lander ES, Green P (1987) Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2363–2367
 30. Licastro F, Veglia F, Chiappelli M, Grimaldi LM, Masliah E (2004) A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25, 1017–1022
 31. Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, et al. (2001) Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6279–6283
 32. Lloyd SE, Uphill JB, Targonski PV, Fisher EM, Collinge J (2002) Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics* 4, 77–81
 33. Lyahyai J, Bolea R, Serrano C, Monleon E, Moreno C, et al. (2006) Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol* 112:451–460
 34. Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, et al. (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res* 11, 1275–1289
 35. Manolakou K, Beaton J, McConnell I, Farquar C, Manson J, et al. (2001) Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7402–7407
 36. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG (2002) Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 326, 67–69
 37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215
 38. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, et al. (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180, 147–150
 39. Moreno CR, Cosseddu GM, Andreoletti O, Schibler L, Roig A, et al. (2003a) [Identification of quantitative trait loci (QTL) modulating prion incubation period in sheep.] *Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat, Toulouse, France, 8–11 December 2002, Communication No. 2–27*
 40. Moreno CR, Lantier F, Lantier I, Sarradin P, Elsen JM (2003b) Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165, 2085–2091
 41. Mrak RE, Griffin WS (2001) Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 903–908
 42. Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuissou E, Sauvezie (1998) IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 87, 309–313

43. Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13363–13383
44. Schultz J, Schwarz A, Neidhold S, Burwinkel M, Riemer C, et al. (2004) Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am J Pathol* 165, 671–678
45. Sciacca FL, Ferri C, Licastro F, Veglia F, Biunno I, et al. (2003) Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 927–931
46. Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, et al. (1993) The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol* 13, 1332–1344
47. Smith M Jr, Eidlen D, Brewer M, Eisenberg S, Arend W, et al. (1992) Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions. *J Immunol* 149, 2000–2007
48. Smith M Jr, Eidlen D, Arend W, Gutierrez-Hartmann A (1994) LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements. *J Immunol* 153, 3584–3593
49. Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, et al. (2000) Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* 69, 47–53
50. Tseng Y-H, Schuler LA (1998) Transcriptional regulation of interleukin-1beta gene by interleukin-1beta itself is mediated in part by Oct-1 in thymic stromal cells. *J Biol Chem* 273, 12633–12641
51. Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AC, Auron PE (1994) Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol* 14, 7285–7297
52. Tsukada J, Waterman W, Koyama Y, Webb A, Auron P (1996) A novel STAT-like factor mediates lipopolysaccharide, interleukin 1 (IL 1), and IL-6 signaling and recognizes a gamma interferon activation site-like element in the IL1B gene. *Mol Cell Biol* 16, 2183–2194 [erratum: *Mol Cell Biol* 16, 3233]
53. Vaiman D, Billault A, Tabet-Aoul K, Schibler L, Vilette D, et al. (1999) Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mamm Genome* 10, 585–587
54. Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S (2002) Genetic control of IL-1beta bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist. *Eur J Immunol* 32, 2988–2996
55. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034
56. Vitkovic L, da Cunha A, Tyor WR (1994) Cytokine expression and pathogenesis in AIDS brain. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 72, 203–222
57. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, et al. (2000) Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 5, 604–615
58. Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, et al. (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651–662
59. Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H (1994a) Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 47–55
60. Williams AE, van Dam AM, Man AHWK, Berkenbosch F, Eikelenboom P, et al. (1994b) Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res* 654, 200–206
61. Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H (1997) Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res* 754, 171–180
62. Xiang W, Windl O, Wunsch G, Dugas M, Kohlmann A, et al. (2004) Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology. *J Virol* 78, 11051–11060



VIII.3. ARTÍCULO *HSP90AA1*

Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Serrano C, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Serrano M (2007b) **Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie.** Cell Stress Chaperones In press

Structural and functional analysis of the *HSP90A41* gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie

ANE MARCOS-CARCAVILLA¹, JORGE H. CALVO², CARMEN GONZÁLEZ¹, KATAYOUN MOAZAMI-GOUDARZI³, PASCAL LAURENT³, MAUD BERTAUD³, HÉLÈNE HAYES³, ANNE E. BEATTIE⁴, CARMEN SERRANO⁵, JABER LYAHYAI⁵, INMACULADA MARTÍN-BURRIEL⁵, AND MAGDALENA SERRANO¹

¹*Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra La Coruña Km 7.5, 28040, Madrid, Spain*

²*Unidad de Tecnología en Producción Animal, Avda. Montañana 930, CITA, 50059, Zaragoza, Spain*

³*Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Département de Génétique Animale, INRA, Centre de Recherche de Jouy, 78352 Jouy-en-Josas, Cedex, France*

⁴*AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand*

⁵*Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain*

E-mail : amarcos@inia.es

Fax: +34 913473783

Tel: +34 913572293

ABSTRACT

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats. Susceptibility to this neurodegenerative disease is mainly controlled by point mutations at the *PRNP* locus. Other genes, apart from *PRNP*, have been reported to modulate resistance/susceptibility to scrapie. On the basis of several studies in Alzheimer and different transmissible spongiform encephalopathy models, *HSP90AA1* was chosen as a putative positional and functional candidate gene that might be involved in the polygenic variance mentioned above. In the present work, the ovine *HSP90AA1* gene including the promoter and other regulatory regions has been isolated and characterized. Several sequence polymorphisms have also been identified. FISH-mapping localized the *HSP90AA1* gene on ovine chromosome OAR19q24dist, which was confirmed by linkage analysis. This chromosome region has been shown to include a QTL (Quantitative Trait Loci) for scrapie incubation period in sheep. Expression analyses were carried out in spleen and cerebellum samples. No differences in the expression of the *HSP90AA1* gene were found in any of these tissues ($p>0.05$) between control and infected animal samples. Nevertheless, association analyses revealed that several polymorphisms in the 5' and 3' regions of the *HSP90AA1* gene were differentially distributed among animals with different responses to scrapie infection. Thus, results presented here support the hypothesis that *HSP90AA1* could be a positional and functional candidate gene modulating the response to scrapie in sheep.

INTRODUCTION

Scrapie (SC) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of sheep and goats. TSEs are neurodegenerative diseases caused by transmissible proteinaceous particles (prions) devoid of nucleic acid that affect man and various animals. The key event in the pathogenesis of prion diseases is the conversion of the host encoded and naturally expressed cellular prion protein

(PrP^C) into its aberrant counterpart PrP^{Sc}. During the conversion process, PrP^{Sc} acquires new biophysical and biochemical characteristics, which lead to its accumulation in the form of amyloid plaques in nervous and lymphoid tissues (Prusiner 1998). However, the mechanism by which PrP^{Sc} causes neurodegeneration remains unclear. Like SC, most of the neurodegenerative diseases are associated with events of protein misfolding. The accumulation of misfolded protein aggregates can overwhelm the ubiquitin-proteasomal system inducing apoptosis and increasing neuronal vulnerability to subsequent insults (Kang et al 2004).

Susceptibility to SC is associated with polymorphisms in the amino acid sequence of the PrP protein. Twenty-five polymorphic codons and 40 haplotypes have been described to date in the open reading frame of the gene encoding the PrP (*PRNP*) (Goldmann et al 2005). In a slightly simplified assessment of genetic susceptibility for a sheep to develop SC, polymorphisms are classified attending to amino acid changes at positions V136A, R154H, and QH171R (Baylis et al 2004). However, significant differences in the incubation period for this neurodegenerative disease have been reported in mice and sheep with the same *PRNP* genotype (Carlson et al 1988; Diaz et al 2005; Dickinson 1975; Westaway et al 1987). Additionally, evidence for other genomic regions containing genes that influence the incubation period for SC in mice (Lloyd et al 2001; Lloyd et al 2002; Manolakou et al 2001; Moreno et al 2003a; Moreno et al 2003b; Stephenson et al 2000) and sheep (Moreno et al 2003a) have been reported. Thus, a reasonable hypothesis is that a major gene (*PRNP*) controlling resistance/susceptibility to SC, coexists with a number of other genes that modulate its effect.

Chaperones are essential proteins involved in the formation and maintenance of the proper conformation of other proteins and promoting cell survival after a large variety of environmental stresses. They protect other proteins against aggregation, solubilize initial, loose protein aggregates, assist in the folding of nascent proteins or in the refolding of damaged proteins, target

severely damaged proteins to degradation and in case of excessive damage, sequester damaged proteins to larger aggregates (Soti et al 2005)

A QTL interval modulating SC incubation period in sheep has been described on ovine chromosome OAR18 (Moreno et al 2003a). By comparing this ovine region with the human and murine genomes, herein we have inferred that it should include the Hsp90 α (cytosolic) class A member 1 gene (*HSP90AA1*).

The chaperone protein known as 90 kDa heat shock protein, Hsp90, is one of the most abundant proteins in eukaryotic cells, comprising 1-2% of cellular proteins under non-stress conditions. There are two major cytoplasmic isoforms of Hsp90, which have arisen by gene duplication, Hsp90 α (inducible form) and Hsp90 β (constitutive form). It is also known that additional Hsp90 paralogs are localized in the endoplasmic reticulum and mitochondria, denoted Grp94/gp96 and Hsp75/TRAP1, respectively. Since separating biochemically the Hsp90 α and Hsp90 β isoforms is rather difficult because they share 85% of sequence identity in higher eukaryotes, most studies have been carried out with a mixture of both isoforms (Sreedhar et al 2004).

Cytosolic Hsp90's contribution to various cellular processes including signal transduction, protein folding, protein degradation, cell survival and morphological evolution has been extensively studied.

It has been shown that Hsp90 specifically influences aggregation at "early" stages in Alzheimer disease avoiding the production of toxic oligomers (Evans et al 2006). Furthermore, Kakimura and co-workers (Kakimura et al 2002) reported that Hsp90 induced microglial activation participating in compensatory neuroprotection through the production of cytokines, enhancement of phagocytosis and clearance of A β in this human disease.

Although the exact role of this chaperone in SC pathology is unknown, it could participate in several aspects of the disease. Thus, Hsp90 α acts as a repressor of HSF1, which is an activator of

heat shock genes. Under stress conditions, non-native proteins accumulate and compete with HSF1 for binding to Hsp90. As a result, HSF1 is released from this complex and becomes active (Zou et al 1998). In addition, it is well known that Hsp90 maintains the functional integrity of the 26S proteasome and participates in its assembly. It is also responsible for refolding stress-damaged proteins and thereby might be sequestered into such damaged proteins after severe insults. In this way, the disassembly of the 26S proteasome could be a consequence of changes in the physiological state of Hsp90 due to stress conditions (Imai et al 2003). It has been demonstrated that wild-type PrP is subjected to ubiquitination and degradation by the proteasome and that a significant fraction of PrP enriched in unglycosylated forms accumulates in the cytoplasm when the activity of the proteasome is compromised (Ma and Lindquist 2001; Yedidia et al 2001). Furthermore, proteasomal activity decreases in mouse SC brains (Kang et al 2004). Taking into account these reports and that both unglycosylated PrP forms and cytoplasmic environment favour the formation of PrP^{Sc}-like forms, it can be hypothesized that, after SC infection, PrP^{Sc} starts to accumulate because its degradation is impaired. Hsp90 could contribute to the correct folding of PrP^{Sc} instead of participating in other functions and thus result in an increased expression of other heat shock proteins, and in a minor proteasomal function. Additionally, as a consequence of the reduced proteasomal activity, the PrP^C, which in normal circumstances is efficiently degraded by this machinery, would accumulate in the cytoplasm, increasing the amount of substrate susceptible of being transformed to the PrP^{Sc} isoform. These arguments led us to study *HSP90AA1* as a possible positional and functional candidate gene contributing to ovine SC resistance/susceptibility modulation.

The first objective of this work was to isolate and characterize the gene, and determine the cytogenetic position of *HSP90AA1* on the ovine genome in order to verify if its localization was in concordance with previous reports describing QTLs associated with resistance/susceptibility

and incubation period for different TSEs in ovine (Moreno et al 2003a) and murine models (Lloyd et al 2001; Lloyd et al 2002; Manolakou et al 2001; Moreno et al 2003b; Stephenson et al 2000). The next step was to verify if there was any difference in the expression of this gene between SC infected and uninfected sheep presenting the same genotype for *PRNP* (*ARQ/ARQ*). Since, as it has been described above, there is no need of Hsp90 α overproduction in order to trigger a stress response, the aim of this point was to gain insight into the possible role of Hsp90 α in SC and in the way it participates in this neurodegenerative disease. This comparison was performed using Real Time RT-PCR on samples of spleen and cerebellum tissues. These are important organs in the development of SC and other TSEs since, after oral infection, prions replicate in the spleen and subsequently migrate to the central nervous system causing a profound neurodegeneration. Finally, the *HSP90AA1* polymorphism was studied in order to perform further association analyses to identify putative mutations in the ovine *HSP90AA1* locus that could explain, at least in part, the polygenic response to SC in sheep.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of sheep specific DNA fragments

Genomic DNA was extracted from ovine lymphocytes according to the salting out procedure described by Miller and co-workers (Miller et al 1988). BAC DNA was purified by a Maxipreparation with the Nucleobond PC 100 Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

In order to isolate and sequence *HSP90AA1* fragments, twelve heterologous primers from human (GenBank NT 026437), murine (GenBank NT039551) and bovine sequences (GenBank NW_930044.1, NW 270059 and NM001012670.1), and thirteen specific primers based on the sequence of the ovine fragments previously isolated with the primers described above, were

synthesized (Appendix 1). Bovine *HSPCAB* mRNA sequence (AB072369) was also taken into account in order to avoid unspecific amplifications due to the high homology level between *HSP90A1* and *HSPCAB* (gene encoding Hsp90 β protein) coding regions. *HSP90A1* regulatory regions were inferred by sequencing both the BAC DNA insert and PCR amplified fragments from genomic and BAC DNA. Genomic (60-100 ng) and BAC DNA (100 ng) were amplified in a final volume of 25 μ l containing 0.5 μ M of each primer, 200 μ M of dNTPs, 1.5 – 2 mM MgCl₂, 2.5 μ l of 10x buffer MgCl₂ free (Biotools) and 1U Taq polymerase (Biotools). In some cases, it was necessary to add DMSO to the PCR mix (see Appendix 1). The following PCR conditions were used: denaturation at 94°C for 5 min, 30 amplification cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 52°C to 59°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s to 1 min 30 s followed by a final 5-10 min extension at 72°C. Primer pairs and their amplification conditions are shown in Appendix 1. The resulting PCR fragments were purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) and bidirectionally sequenced with the PCR primers. The identity of the fragments was confirmed by BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As indicated in Appendix 1, the fragment generated with primers that hybridized with regions at -570 and intron 2 had to be sequenced with different primers from those used to perform the PCR reaction due to the secondary structures that they formed. Additional primers also had to be used to sequence the region amplified between -700 and +400 positions because of the presence of insertion/deletion polymorphisms.

Chromosomal location

Ovine *HSP90A1* gene was localized in the ovine genome by two approaches: cytogenetic and genetic mapping.

Cytogenetic mapping: Primers located in *HSP90AA1* intron 10 and exon 11 (see Appendix 1) were used to screen an ovine BAC library (Vaiman et al 1999). DNA from the identified BAC clone was labelled by nick-translation in the presence of biotin-14-dATP (BioNick TM 18247-015 labelling system) and used as probe for in situ hybridisation on RBP-banded ovine chromosome preparations following the protocol described by Hayes and co-workers 1991.

Genetic mapping: Genomic DNA from five domestic sheep breeds (Latxa (n=2), Manchega (n=5), Awassi (n=1), Assaf (n=1) and Rasa Aragonesa (n=1)) was amplified and sequenced as previously described and analyzed using CHROMAS 1.43 and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) software in order to detect polymorphisms along the isolated sequences of *HSP90AA1*, without taking into account either their *PRNP* genotype or their pattern of SC resistance/susceptibility. Animals were chosen from different breeds to avoid any problem due to allele fixation because of the selective status of these breeds in our country (Spain), and the identification of a representative polymorphism at the species level.

In order to follow the distribution of the gene within the pedigrees of the AgResearch International Mapping Flock (IMF), the SNP (A/G) located at position 84 in the *HSP90AA1* intron 10 was analyzed by PCR-RFLP using primers that hybridized *HSP90AA1* exons 10 and 11 (see Appendix 1). The reaction product (8 µl) was digested with 0.2 U of *Tsp509I* at 65°C over 19 hours in a final volume of 18 µl and then electrophoresed on a 3% agarose gel for visualization.

Thus, cytogenetic localization was confirmed by linkage mapping in nine sheep families. *HSP90AA1* gene was mapped against markers on the sheep framework map (Maddox et al 2001). Multipoint linkage analysis of the IMF pedigrees (Crawford et al 1995) was performed using CRI-MAP (Lander and Green 1987).

Gene expression

A total of 13 Rasa Aragonesa female sheep (aged 3–5 years) with the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*) were included in this study. Eight of them exhibited clinical signs of SC in a terminal state. *PRNP* genotypes were determined according to Acin and co-workers (Acin et al 2004). The diagnosis was confirmed using a rapid test and immunohistochemistry to detect PrP^{Sc} (Bolea et al 2005). These animals belong to a flock of sheep, conserved for research purposes by the Prion Research Centre of the University of Zaragoza and where several SC cases have appeared in the last 4 years. Control animals (n = 5) were selected from a different flock belonging to the same breed, where no SC had been reported to date.

The aim of this sample design was to determine if SC disease might cause any change in the expression pattern of *HSP90A41*. Thus, small fragments of spleen and cerebellum were included in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). Total mRNA was purified from spleen and cerebellum with the RNeasy Mini Kit and the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), respectively. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of each RNA preparation using random hexamer primers with the SuperScript First-Stranded Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Gene expression levels were subsequently determined by Real Time RT-PCR. All RT-PCR reactions were run in duplicate. Two tissue specific housekeeping genes were used to normalize each set of results. Data from the spleen were normalized for succinate dehydrogenase complex, subunit A (*SDHA*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA. Hexose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) and *18S rRNA* mRNA were used in the case of cerebellum. Primers and probes used for gene expression analysis, their concentrations and amplicon sizes are shown in Appendix 2. Amplification was carried out in a final volume of 25 µl containing SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) or TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase

UNG (Applied Biosystems), depending on the gene analyzed (see Appendix 2). After preheating the mix at 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s were carried out.

It was necessary to sequence a fragment of the cDNA containing part of exon 10 through intron 11 in order to synthesize a pair of primers adequate to carry out the Real Time RT-PCR. These primers were F: 5'- TTGGTGACATCCCCATGCTG -3' and R: 5'- CAACAGTCATCTGTTTAGG -3', which hybridized with *HSP90A1* exons 10 and 11, respectively. Amplification conditions were those described in the first section of materials and methods. The annealing temperature was 56°C, the extension time 30 s and MgCl₂ concentration 2mM. All the resulting PCR fragments were purified with ExoSAP-IT (USB) and bidirectionally sequenced using the PCR primers and the BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). The identity of genes was confirmed by BLAST comparison with the GenBank database.

The normalization factor (NF) (Vandesompele et al 2002) was calculated as the geometric mean of the quantity (Q) of the two housekeeping genes of each tissue (*SDHA* and *GAPDH* for spleen and *G6PDH* and *18S* mRNA for cerebellum). The normalized expression level of *HSP90A1* mRNA ($n_{HSP90A1}$) was calculated as the ratio between the Q values of *HSP90A1* and the NF calculated for each sample. Later, this ratio ($Q_{HSP90A1} / NF$) was transformed according to the expression $\arcsin \sqrt{(n_{HSP90A1} \times 100^{-1})}$ as recommended for parametric tests on relative data. Finally, a T-test was run to compare the means of the two samples. The test was constructed to determine whether the differences between the means of expression data from naturally infected and control animals were equal to zero or not.

Polymorphism detection

cDNA from the thirteen Rasa Aragonesa breed sheep, with the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*) used in the expression analysis was used in an attempt to identify polymorphism in the coding region of *HSP90AA1* gene that might cause an amino acid change. In addition, genomic DNA from 80 *ARQ/ARQ*, Rasa Aragonesa sheep (see association analysis section and Table 1 to 4) was examined and used to perform association analysis. Thirty-one of them (infected) exhibited clinical and immunohistochemical signs of SC while the remaining 49 (healthy) did not. All these animals belong to six flocks of sheep, conserved for research purposes by the Prion Research Centre of the University of Zaragoza and where several SC cases have appeared in the last four years. *PRNP* genotypes and SC diagnosis were assessed as explained before (Acin et al 2004; Bolea et al 2005). In order to determine if the SNP's genotype distribution found in this group of animals was representative of other breeds or exclusive of the Rasa Aragonesa group, an additional genotyping of 38 *ARQ/ARQ* sheep belonging to the Manchega and Assaf breeds, which had no contact with SC, was carried out.

Association analysis

It is well established that there are significant differences among breeds in which *PRNP* genotypes are attacked by SC. For instance, the *ARQ/ARQ* genotype shows different resistance to SC infection depending on the breed studied (Baylis et al 2004). Nevertheless, there is no evidence of any correlation between the occurrence of a specific *ARQ* haplotype, considering all the SNPs between codons 112 and 241 of the *PRNP*, and the SC disease status of a flock (Goldmann et al 2005).

HSP90AA1 polymorphism was studied on a total of 80 Rasa Aragonesa breed sheep displaying the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*).

Since one of the major sources of variability in SC resistance/susceptibility and/or incubation period associated with Hsp90 α might be explained by differences of expression of this chaperone, we decided to look for polymorphism in the 5' and 3' flanking regions of *HSP90AA1* gene. Sixty-seven sheep (27 infected and 40 healthy) were sequenced to study the 5' flanking region (thirteen sheep from the 80 initial sample were not available in this case). To analyze the 3' flanking region, 80 animals (31 infected and 49 healthy) were studied. Thus, genomic DNA from these sheep was amplified, sequenced and analyzed, as previously described. The primer pairs used hybridized with regions located at -700 bp and + 400 bp from the transcription start site and in exons 10 and 11.

Finally, association analysis was performed with the CATMOD procedure of the SAS statistical package [SAS, 1989], which is a procedure for categorical data modelling. In this case, the standard response function (generalized logits) was used, because there were only two response levels, being the maximum likelihood the estimation method. Analysis took into account response to SC (presence/absence of clinical signs and positive immunohistochemistry for PrP^{Sc}) as the dependent variable and the genotypes for the SNPs tested as the independent factor.

RESULTS

Isolation of the ovine *HSP90AA1* gene and polymorphism detection

Two cDNA fragments corresponding to exons 2 to 5 (921 bp) and exons 7 to 11 (1123 bp) (Genbank accession number EF091713), and a sequence of 5917 bp containing the complete coding sequence, interrupted by 10 introns, and 1000 bp of the 5' flanking region of *HSP90AA1* gene were isolated.

Exons were identified by comparison with the ovine and bovine mRNA sequences (EF091713 and AB072368.1, respectively). Each *HSP90AA1* intron showed the GT/AG consensus splice

junction described by Breathnach and Chambon 1981. Thus, the whole *HSP90AA1* ovine gene comprises eleven exons and ten introns. The precise length and full sequence of each one were determined (GenBank accession no DQ983231).

In addition to the coding region of the *HSP90AA1* gene, a sequence of more than 1000 bp corresponding to the 5' flanking region of the gene was analyzed. Several consensus sequences typical of promoter regions including a putative TATA box and several SP1 consensus sites (Dale et al 1996) were identified in this 5' flanking region. More interesting is the presence of several heat shock elements (HSEs), which are binding sites for the heat shock factor (HSF-1) involved in the inducible gene expression of *hsp90α*. The human *HSP90AA1* core promoter described by Zhang and co-workers 1999 is also conserved in sheep. Additional *cis*-regulatory elements were identified with the informatics programs TFSEARCH and Signal Scan (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> and <http://bimas.dcrtnih.gov/molbio/signal/>, respectively), which predicted several putative binding sites for various *trans*-acting factors, the most important ones being Lyf-1, CdxA, SIF and, of course, SP-1, TATA binding protein and HSF-1.

Thirty-four polymorphisms were identified within the isolated fragments: twelve in the coding region (exons 4, 7, 8, 9, 10 and 11), fourteen in the 5' flanking region and eight in the *HSP90AA1* intron 10 (see Fig 1 and DQ983231). None of the SNPs located in the *HSP90AA1* coding region produced any change in the amino acid sequence. The SNP (A/G) located at position 84 in the ovine *HSP90AA1* intron 10 was further analyzed within the IMF families for linkage mapping.

Chromosomal localization of ovine *HSP90AA1* gene

The ovine *HSP90AA1* gene was mapped to OAR18q24dist by FISH using the ovine BAC library (Vaiman et al 1999) at INRA-CRJ (Jouy-en-Josas, France). These results were confirmed by

linkage mapping using the IMF pedigrees. The best supported linkage map of the relevant region of chromosome 18 including the *HSP90AA1* gene is shown in Fig 2 and was obtained by CRI-MAP multipoint analysis, after performing the two-point and flips options. *HSP90AA1* was located at the end of ovine chromosome 18, next to VNTR16.

Gene expression analyses

The expression of Hsp90 α was studied by Real Time RT-PCR in spleen and cerebellum tissues. Standard curves for the genes studied present the appropriate slopes and correlation values (slope > -4 , $r^2 = 0.99$). No significant differences in the expression of *HSP90AA1* between affected and healthy animals were found either in spleen or in cerebellum ($p > 0.05$).

Polymorphism detection and association analysis

Considering the many pathways in which this chaperone is involved, it is possible that a polymorphism affecting *HSP90AA1* expression could explain part of the inter-individual response to SC that is not related with the *PRNP* genotype.

The polymorphism at 5' flanking region and intron 10 of *HSP90AA1* was studied on animals belonging to Rasa Aragonesa ($n=80$) and Manchega and Assaf ($n=38$) breeds sheep, displaying the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*).

5' flanking region: Fourteen polymorphisms were detected in the 5' flanking region. As previously mentioned, part of these polymorphisms were located within possible *trans*-acting factors binding sites. For instance, the C/G SNP at -660 is in a putative Lyf-1 site, the -528 and -524 A/G and G/T substitutions are present in SIF and SP-1 consensus sites respectively, and an additional A/G polymorphism was found at -444 affecting a CdxA site. These represent a small sample of the putative *cis*-regulatory elements identified within this region. The fourteen polymorphisms identified in the *HSP90AA1* 5' flanking region are represented in Fig 1A and 1B.

After discarding the SNPs presenting extreme allelic frequencies, only the genotype of the three SNPs located at positions -660, -528 and -524 were analyzed. Table 1 showed genotypic frequencies and its confidence intervals (95%) for the SNPs identified at positions -660, -528 and -524 in Rasa Aragonesa healthy and disease animals and in animals of Manchega and Assaf breeds. Since samples had enough size ($n > 30$), we can assume that binomial proportions trend to normal distributions, and therefore, confidence intervals for the frequencies can be calculated. In those cases in which proportions were no different from zero, confidence intervals could not be calculated. Similar genotypic frequencies in Rasa Aragonesa, Manchega and Assaf breeds were observed for the three SNPs studied (Table 1). However, between healthy and disease animals of Rasa Aragonesa breed clear differences between genotypic frequencies at positions -660 and -528 were detected. Thus, the CCAA linked genotype at these positions, was more frequent in the healthy than in the disease group. Conversely, the heterozygous genotype CGAG, for these SNPs, was predominant in the disease sample. This event was independent from the genotype obtained for the SNP at -524 position. The grouped genotypes for the three SNPs at positions -660, -528 and -524 of the *HSP90AA1* 5' flanking region, in Rasa Aragonesa healthy and disease animals, are shown in Table 2. Although it is not possible to know the ancestral allele, taking into account the frequencies of genotypes found in the analyzed sample (see Table 2), the existence of the CAT, CAG, GGT and GAT alleles could be inferred. It is worthy to mention that, despite the GAT allele appeared just one within the Rasa Aragonesa sample, within the Manchega and Assaf group it appears three times, confirming the real existence of such allele. Distribution of *scrapie* cases among genotypes indicate that the SNP located at -524 has not influence in the probability to develop the disease (see Table 1 and 2). For this reason, only the two first SNPs at the 5' flanking region (-660 and -528) were used to carry out the association analyses. In this way, maximum likelihood variance analyses revealed that predicted haplotypes for these two positions

were statistically associated ($p\text{-value}<0.0002$) with the presence/absence of the disease. Thus, the *CA* allele was overrepresented in healthy sheep, whereas the *GG* was more common in infected animals. The *GA* allele was not considered due to its reduced representation in this case.

3' flanking region: After discarding the SNPs presenting extreme allelic frequencies, six SNPs located at positions 40, 165, 178, 205, 220 and 239 of *HSP90A41* intron 10, which showed a complete linkage, were analyzed. Frequencies for the homozygous genotype (*GG CC GG CC TT TT*) were 93.8% of Rasa Aragonesa and 94.8% of the Manchega and Assaf sheep breeds. The remaining 6.2% of Rasa Aragonesa and 5.2 % of the Manchega and Assaf sheep breeds, were heterozygous with a *AG CT CG CG CT CT* genotype. No animal with the *AA TT GG GG CC CC* genotype was identified.

Maximum likelihood variance analyses of the genotypes for this six SNPs showed statistical significance ($p\text{-value}=0.0022$) with the presence/ absence of the disease. Within Rasa Aragonesa breed, the 100% of the heterozygous sheep were infected, while only the 35 % of the homozygous animals catch the disease.

DISCUSSION

We have isolated and characterized the ovine *HSP90A41* gene, which consists of 11 exons ranging in size from 60 to 367 bp interrupted by 10 introns ranging in size from 92 to 456 bp. This gene organization is conserved in the human (at least in the region isolated in the present work, see below), murine and bovine homologues (Dale et al 1996); NW_930044.1, NW 270059 and NM001012670.1). The relative position of each intron is also conserved including the position of the first intron exactly at the boundary between exon 1 and the initiation of translation site (ATG). This unusual positioning of the first intron is a feature shared by other members of

the *HSP90* gene family (Dale et al 1996). Additionally, various regulatory regions, also present in man, mouse and cattle have been determined.

The coding region is very similar among these three species (>90% sequence homology), except that the human sequence has three nucleotides less than the ruminant counterpart. Thus, the protein in cattle and sheep contains 733 amino acids, whereas the human homolog lacks a glutamic acid at position 266. Amino acid sequences in cattle and sheep are 100% identical. At this point, it is interesting to mention that five different transcript variants have been described for this gene in man, the larger form consisting of 854 amino acids whereas the shortest has only 413 amino acids (Chen et al 2005). Although we could not identify the coding region for all these variants neither in cattle nor in sheep, the sequence isolated in the present work, contains the variant that is expressed most ubiquitously in man (Chen et al 2005).

The localization of the ovine *HSP90AA1* gene on OAR18q24dist, next to the marker OY5 (Fig 2), is consistent with comparative mapping information since this gene maps to human chromosome 14 and mouse chromosome 12. Ovine chromosome 18 has already been reported as containing a QTL region involved in incubation period to SC (Moreno et al 2003a) and it is interesting to note that the *HSP90AA1* gene is located within the proposed interval. This result supports the hypothesis that *HSP90AA1* may be a positional candidate gene modulating the response to SC infection in sheep.

Expression results revealed no differences in *HSP90AA1* mRNA concentration between the two groups of sheep (infected and uninfected) analyzed. This suggests that SC infection is not the cause of any change at the *HSP90AA1* mRNA level. But, there are several things that should be taken into account in order to avoid inferring erroneous conclusions: 1) the number of tissues analysed (spleen and cerebellum) was limited. It is possible that *HSP90AA1* mRNA varies in other regions not studied in the present work. 2) the existence of transcript variants that could not

be detected with the primers used (they hybridise with exons 10 and 11), 3) Jacquier-Sarlin and co-workers 1995 have suggested that under conditions associated with sustained Hsps expression such as inflammation or ischemia, Hsps synthesis results from a post-transcriptional regulatory mechanism. Thus, the regulation of *HSP90AA1* during SC could occur at the translational level, and the increase in Hsp90 α synthesis might be via the activation of transcription of stored mRNA. This is conceivable since the *HSP90AA1* mRNA level decreases by 20% and 10%, in spleen and cerebellum respectively, in SC infected sheep as compared with controls (data not shown).

Even though it is real that Hsp90 α does not change during SC infection, we suggest that any cause leading to an up or down regulation of cytosolic Hsp90 could have important consequences along the SC neurodegeneration process. Genetic polymorphism is an acknowledged source of phenotypic variation. Considering that Hsp90 α is the inducible form of cytoplasmic Hsp90s, any polymorphism at the *HSP90AA1* locus modifying the activity of Hsp90 α could affect the neurodegeneration process in SC infected animals. This is why we decided to study the polymorphism in the regulatory regions of these genes among sheep with the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*), which, although exposed to SC infection, present different responses to it (infected vs healthy).

Among the 34 polymorphisms identified within the isolated fragments, 3 SNPs in the 5' flanking region (positions: -660, -528, -524) and 6 SNPs in the 3' end (positions: 40, 165, 178, 205, 220, 239 of intron 10) were included in the association analyses. These analyses showed significant results for the *C/G* and *A/G* substitutions at -660 and -528 ($p < 0.001$) and for the *A/G C/T C/G C/G C/T C/T* linked SNPs in the *HSP90AA1* intron 10 ($p < 0.01$).

A survey of the literature and the use of the programs TFSEARCH and Signal Scan to determine if all these changes affect any regulatory element showed that the region upstream of the

HSP90A41 minimal promoter contains apparently multiple elements controlling *HSP90A41* gene transcription (Fig 1A). Thus, the (C)(C)CCCCCCC/gA sequence, located between -667 and -660 positions, is very similar to the consensus motif for IKAROS/LYF-1 family members described in the human B29 promoter (CCTCCCCCA) by Thompson and co-workers 1996. In addition, this ovine sequence is identical with a ZBP-89 binding site described in the 5' region of the vimentin gene (GGACCCCCCCC) by Zhang and co-workers 2003. ZBP-89 has been reported to bind regulatory regions of various genes, and it appears to act both as transcriptional activator and repressor (Yamada et al 2001). In addition, ZBP-89 is known to interact with SP elements and the SNPs (G/T and A/G) at locations -524 and -522 in the *HSP90A41* 5' flanking region are both affecting an SP1 binding site described by Dale and co-workers 1996 in the *HSP90A41* murine promoter. On the other hand, the SNP (A/G) at -528 affects a putative *Sis*-Inducing Factor (SIF) binding site (CCCG/aTM). The sequence of this putative regulatory element is very similar to the core sequence of the SIF binding site described by Wagner and co-workers (1990) in the *c-fos* promoter (CCCGTC). SIF complexes are dimerized forms of signal transducers and activators of transcription (SAS Institute Inc.) factors which, after being activated by different ligands, translocate into the nucleus to direct the transcription of specific target genes (Wang et al 2006). Thus, mutations at these sites might yield different rates of ovine *HSP90A41* transcription due to positive or negative interactions between different transcriptional regulatory elements. These different transcription levels might have important effects on SC incubation period.

Sequence analysis of intron 10 and exon 11 revealed eleven other polymorphisms. In this case, results from the association analysis were not as clear as those reported above because only five infected individuals presented the genotype (AG CT CG CT CT CT) for the six linked SNPs in *HSP90A41* intron 10. Nevertheless, since it has been shown that efficiency of RNA 3'-end formation is correlated with the efficiency of the final intron removal, and that the influence of

the 3'-terminal intron on 3'-end formation can be attributable to the determinants of splicing efficiency (Nesic and Maquat 1994), these SNPs are not less interesting than those described in the 5' flanking region. Thus, some of the mutations found within the ovine *HSP90AA1* intron 10 may interfere with these post-transcriptional regulatory steps affecting the level of *HSP90AA1* expression. To sum up, individuals capable of producing more Hsp90 α under different conditions would have a minor proteasomal activity inhibition when they are submitted to SC infection. As a consequence, in these individuals, cytoplasmic PrP^C accumulation would be lower, decreasing the conversion and aggregation process and extending the incubation period.

Although additional experiments should be performed in order to determine the exact implication of these polymorphisms in SC development, it can be concluded that *HSP90AA1* is a good positional and functional candidate gene modulating SC incubation period in sheep. Thus, the GG and ATCTCC alleles, for positions described at 5' flanking region and intron 10 are associated with higher susceptibility to SC. In a new project, which we have just started with the aim of studying in depth the *HSP90AA1* polymorphism, we have found the third genotype for the intron 10 region (AA TT CC TT CC CC). Additionally, it seems that some of the polymorphisms are differentially distributed within different breeds. Nevertheless further analyses should be performed in order to see if there are any differences in Hsp90 α expression that could be explained by the polymorphisms described in the present work, and to test if combinations of the alleles described for the *HSP90AA1* 5' flanking region and intron 10 can interact to modulate the response to SC in sheep.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CERSYRA-Valdepeñas and AGRAMA breeders association, CSIC-León, CITA-Aragón, Prion Research Centre of the University of Zaragoza - and INIA-Madrid for kindly

providing Manchega, Awassi, Assaf, Rasa Aragonesa and Mouflon samples. We are very grateful to Dr. K.G. Dodds for his suggestions and English correction of the manuscript, to PhD MA Roca for helping us with the PCRs improvement, to Dr. C.R. Moreno for her suggestions in the statistical area, to Dr. M.E.F. Alves for her continuous help and to Dr. E.P. Cribru and Dr. P. Zaragoza for allowing us to perform the cytogenetic mapping and the expression analysis in their respective laboratories. This work was supported by the RTA2006-00104 INIA project, and a Predoctoral Grant from the INIA.

REFERENCES

- Acin C, Martin-Burriel I, Goldmann W, et al. 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol* 85: 2103-2110.
- Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Goldmann W, Smith A, Sivam K, Tongue S, Gravenor MB. 2004. Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J Gen Virol* 85: 2735-2740.
- Bolea R, Monleon E, Schiller I, et al. 2005. Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest* 17:467-469.
- Breathnach R, Chambon P. 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50: 349-383.
- Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, Westaway D, Prusiner SB. 1988. Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol* 8: 5528-5540.
- Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, et al. 1995. An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome. *Genetics* 140: 703-724.
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. 2005. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86: 627-637
- Dale EC, Yang X, Moore SK, Shyamala G. 1996. Cloning and characterization of the promoter for murine 84-kDa heat-shock protein. *Gene* 172: 279-284.
- Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM. 2005. Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol* 86: 849-857.

- Dickinson AG. 1975. Host-pathogen interactions in scrapie. *Genetics* 79 Suppl: 387-395.
- Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE. 2006. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta (1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* 281:33182-33191.
- Garcia-Crespo D, Juste R, Hurtado A. 2005. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research* 1: 3.
- Goldmann W, Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Hunter N. 2005. Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *Journal of Applied Microbiology* 98:1294-1302.
- Hayes H, Petit E, Dutrillaux B. 1991. Comparison of RBG-banded karyotypes of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet* 57: 51-55.
- Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K. 2003. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *Embo J* 22: 3557-3567.
- Jacquier-Sarlin MR, Jornot L, Polla BS. 1995. Differential Expression and Regulation of hsp70 and hsp90 by Phorbol Esters and Heat Shock. *J Biol Chem* 270: 14094-14099.
- Kakimura J-I, Kitamura Y, Takata K, et al. 2002. Microglial activation and amyloid- β clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J*. 16: 601-603.
- Kang SC, Brown DR, Whiteman M, et al. 2004. Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. *J Pathol* 203: 603-608.
- Lander ES, Green P. 1987. Construction of Multilocus Genetic Linkage Maps in Humans 10.1073/pnas.84.8.2363. *PNAS* 84: 2363-2367.
- Lyahyai J, Bolea R, Serrano C, et al. 2006. Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 112: 451-460.
- Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, Targonski P, Collinge J, Fisher EM. 2001. Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6279-6283.
- Lloyd SE, Uphill JB, Targonski PV, Fisher EM, Collinge J. 2002. Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics* 4: 77-81.
- Ma J, Lindquist S. 2001. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *PNAS* 98: 14955-14960.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, et al. 2001. An Enhanced Linkage Map of the Sheep Genome Comprising More Than 1000 Loci

10.1101/gr.GR-1350R. *Genome Res* 11: 1275-1289.

Manolakou K, Beaton J, McConnell I, Farquar C, Manson J, Hastie ND, Bruce M, Jackson IJ. 2001. Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *PNAS* 98: 7402-7407.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16:1215.

Moreno CR, Cosseddu GM, Andreoletti O, et al. 2003a. Identification of quantitative trait loci (QTL) modulating prion incubation period in sheep. (Identification de QTL affectant la durée d'incubation de la tremblante chez les ovins.). (Toulouse: Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat), Toulouse, France, 8-11 December 2002, Communication No. 2-27.

Moreno CR, Lantier F, Lantier I, Sarradin P, Elsen JM. 2003b. Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165: 2085-2091.

Nesic D, Maquat LE. 1994. Upstream introns influence the efficiency of final intron removal and RNA 3'-end formation. *Genes Dev* 8: 363-375.

Prusiner SB. 1998. Prions. *PNAS* 95: 13363-13383.

SAS Institute Inc., SAS/STAT® Users's Guide, version 6, Fourth Edition, Volume1, Cary, NC:, 1989.

Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 146:769-780.

Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11-15.

Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA. 2000. Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* 69: 47-53.

Vaiman D, Billault A, Tabet-Aoul K, Schibler L, Vilette D, Oustry-Vaiman A, Soravito C, Cribiu EP. 1999. Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mamm Genome* 10: 585-587.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

Wagner BJ, Hayes TE, Hoban CJ, Cochran BH. 1990. The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *Embo J* 9: 4477-4484.

- Wang XD, Chen XM, Wang JZ, et al. 2006. Signal transducers and activators of transcription 3 mediates up-regulation of angiotensin II-induced tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cultured human senescent fibroblasts. *Chin Med J (Engl)* 119: 1094-1102.
- Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51: 651-662.
- Yamada A, Takaki S, Hayashi F, Georgopoulos K, Perlmutter RM, Takatsu K. 2001. Identification and Characterization of a Transcriptional Regulator for the Ick Proximal Promoter. *J Biol Chem* 276: 18082-18089.
- Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A. 2001. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.* 20: 5383-5391.
- Zhang SL, Yu J, Cheng XK, Ding L, Heng FY, Wu NH, Shen YF. 1999. Regulation of human hsp90alpha gene expression. *FEBS Lett* 444: 130-135.
- Zhang X, Diab IH, Zehner ZE. 2003. ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucl Acids Res* 31: 2900-2914.
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94: 471-480.

Table 1: Genotypic frequencies and confidence interval for the SNPs in the 5' flanking region of the *HSPCAAI* gene in animals of several sheep breeds.

Position	Genotype	<i>Rasa Aragonesa</i>		<i>Manchega and Assaf</i>	
		frequency (%)		frequency (%)	
		Whole (n=67)	Healthy (n=40)	Disease (n=27)	(n=38)
-660	CC	59.4 (47.3-71.4)	76.3 (62.8-89.8)	34.6 (16.3-52.9)	50.0 (34.1-65.9)
	CG	35.9 (24.2-47.7)	21.1 (8.1-34.0)	57.7 (38.7-76.7)	34.2 (19.1-49.3)
	GG	4.7*	2.6*	7.7*	15.8 (4.2-27.4)
-528	AA	59.4 (47.3-71.4)	76.3 (62.8-89.8)	34.6 (16.3-52.9)	60.5 (45.0-76.0)
	AG	35.9 (24.2-47.7)	21.1 (8.1-34.0)	57.7 (38.7-76.7)	31.6 (16.8-46.3)
	GG	4.7*	2.6*	7.7*	7.9*
-524	TT	75.0 (64.4-85.6)	71.0 (56.6-85.4)	80.8 (65.6-95.9)	68.4 (53.6-83.2)
	GT	25.0 (14.4-35.6)	29.0 (14.5-43.3)	19.2 (4.1-34.4)	26.3 (12.3-40.3)
	GG	0.0	0.0	0.0	5.3*

Confidence interval at 95% in brackets

*Frequency estimates no different from zero.

Table 2: Genotypes detected for the SNPs at positions -660, -528 and -524 in the 5' flanking region of the *HSP90AA1* gene.

<i>Genotype</i>			<i>Number of</i>	<i>Number of</i>	<i>Probability of</i>	<i>Probability of</i>	
LYF	SIF	SP1 ^a	<i>Number of</i> <i>animals</i>	<i>healthy</i> <i>animals</i>	<i>infected</i> <i>animals</i>	<i>healthy</i> <i>animals</i>	<i>infected</i> <i>animals</i>
<i>CC AA GG^b</i>			2	2	0	0.050	0.000
<i>CC AA GT</i>			11	10	1	0.250	0.037
<i>CC AA TT</i>			27	19	8	0.475	0.296
<i>CG AA TT^b</i>			1	0	1	0.000	0.037
<i>CG AG GT^b</i>			5	1	4	0.025	0.149
<i>CG AG TT</i>			18	7	11	0.175	0.407
<i>GG GG TT^b</i>			3	1	2	0.025	0.074
			67	40	27		

^a Putative regulatory motif that could be affected by the SNP

^b The estimated probabilities for these genotypes should be cautiously considered due to the small number of animals found in the analyzed sample.

The number of healthy and infected Rasa Aragonesa breed sheep and the probability of developing the disease based on the genotype are shown.

$\chi^2=15.9452$ for the contingency table and $p\text{-value} = 0.014$ ($p<0.05$)

Table 3. Genotypes detected for the SNPs at positions 40, 165, 178, 205, 220 and 239 of the ovine *HSP90AA1* intron 10.

<i>Genotype</i>	<i>n°</i>	<i>n° healthy</i>	<i>n° infected</i>	<i>Probability of</i>	<i>Probability</i>
	<i>animals</i>	<i>animals</i>	<i>animals</i>	<i>healthy</i>	<i>infected</i>
<i>GG CC GG CC TT TT</i>	75	49	26	1.000	0.839
<i>AG CT CG CT CT CT</i>	5	0	5	0.000	0.161
	80	49	31		

The number of healthy and infected Rasa Aragonesa breed sheep and the probability of developing the disease based on the genotype are shown.

$\chi^2=8.4301$ for the contingency table and *p-value* = 0.004 ($p<0.005$)

Fig 1.— Polymorphisms and *cis*-acting elements localized within ovine *HSP90A41* 5' (A and B) and intron 10 (C and D) flanking regions. A: Sequence amplified with -700 and +400 primers. Here are represented the polymorphisms found within this region and putative binding sites for Lyf-1 (-667 to -660), and CdxA (-451 to -444) factors predicted with the TFSEARCH program. *Cis*-acting elements previously described for the *HSP90A41* murine gene (DALE *et al* 1996) are also indicated: SP-1 sites (-525 to -520 and -256 to -251), HSE (-82 to -60) and the TATA box (-29 to -23). The binding sites for ZBP-89 (-667 to -660) and SIF (-531 to -526) factors described in the promoters of other genes are also shown (WAGNER *et al* 1990; ZHANG *et al* 2003). Exon 1 is shown in bold capital letters. B: Summary of the most interesting polymorphism found within the *HSP90A41* 5' flanking region. Their location, the *trans*-acting factor that binds to them and the sequence of the *cis*-element are shown. C: Intron 10 is represented. D: Summary of the most interesting polymorphism found within *HSP90A41* intron 10.

A)

```

-719 acogctgccctggcaagagatgcgcctagacctctaatcg ctgccgga (c)(c)cccccc/gaaacccctaacc
-647 atggacctgagcctgogatcaatgccccaaagcatataacctgtgacaa/cgggactggaccctcaccocggctttgatcc
-569 cctaagcgcggcctcaaggctcgaacctagccccaggccca/gtagg/tga/gggggg(g)tcocgatgctggggggat
-498 ccggagcgcacactatctggggacacgcttg/taaccaccgagagtttacttttctt/ggacttccagagctgctggca
-422 cgggcgatcagccccggggcctggacagaggttgggtcgggggagcgttaggcgacgcgcgcaagcgggttggcg
-342 ggccagcgtgtgaggcggcgggcgacagacgcgcga/gcgcggga/gc/taggtaggctgggaacggcgacccg
-268 gaaggcgcagagaccgc/ggggaacgctc cgatagcgcaggcgactgcggcgggcgcgggcacgcttggcacgaggc
-190 gccctgagcggtgggagcgcggcgcgcccgaggagggggcgggcgccctccagtgcgcaggcgacggcgcgcgcc
-110 gtcgcggcggttggggaggggttttccgaaaggttcgggaagccttctgaaaggcgccgcgcgtggcgggcccgct
-30 ctatataaggcgcgcgggggcgcgcgcc CAGTTGCCTCTGCGTCCCGGTGCTGCGTGGAGAGCCGCTGCTAGTC
+51 CTTACGCCAAGtgaggggagggcgtttagggggacgcggggtccacggcggggtggcgcgcgcgaggg

```

B)

Position	Polymorphism	Cis-Factor	Sequence
-667	(C) and/or (CC)	Lyf-1 or ZBP-89	gga(c)(c)cccccc/gaaa
-660	C/G		
-528	A/G	SIF	ccca/gta
-524	G/T	SP-1	gg/tca/ggg
-522	A/G		
-444	A/G	CdxA	tttcta/g
-252	C/G	SP-1	cccgc/gc

C)

```

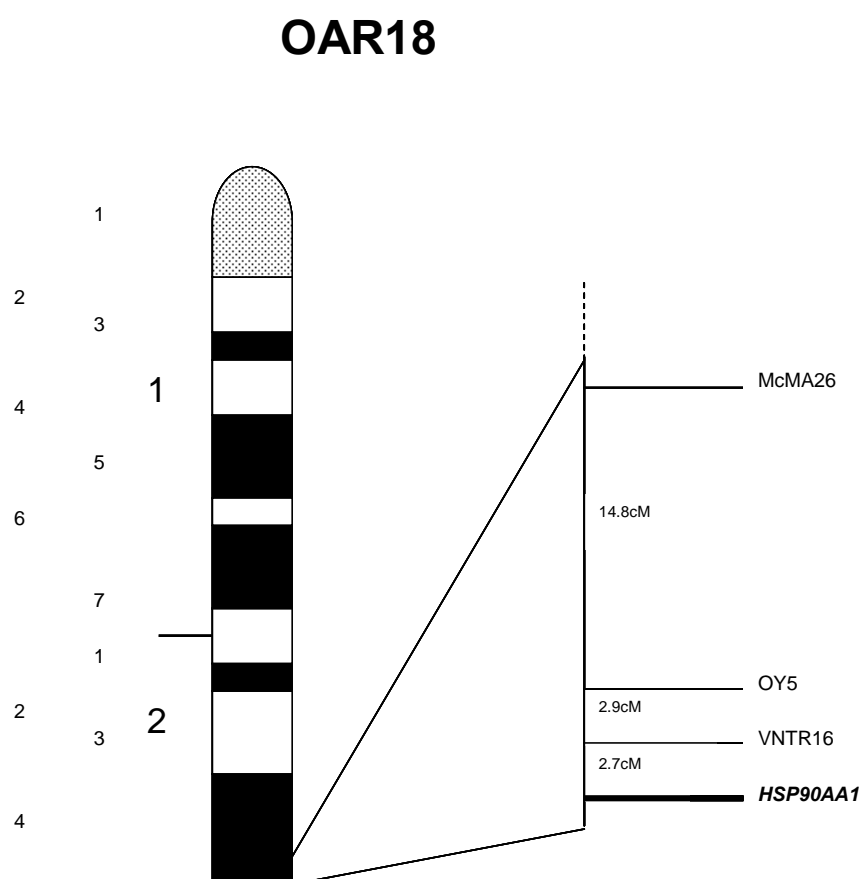
1 gtaagccttgtgcaagtaccatgtgtaataccattgggga/ga/gaaacctaaacagatgactgttgaagggtgaaact
77 ttacgcaa/gtttcaacaaagtgggcactctgtttttccatttgcaaaacactgaagtacatgagttaaagggggt
155 aaataagccc/ttttcgtcatgtc/ggttctaattcgctcagccttgagaagc/ggggtatgaggaacc/tgtagt
227 ttggacc/taattac/tcggcctgaagaaactaatccgtgtttttatttccttcaag

```

D)

	Position	Polymorphism
Intron 10	40	A/G
	165	C/T
	178	C/G
	205	C/G
	220	C/T
	239	C/T

Fig 2.— Cytogenetic (left) and genetic (right) maps showing *HSP90AA1* gene localization on sheep chromosome 18.



Appendix 1. List of primers used to amplify and/or sequence *HSP90A1* gene.

DNA source	Primer localization	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size	Ta	Ext. time	DMSO
BAC	- 584	GGTCCAGTCCCTTGTCACAG		-	-	-	-
BAC	Exon1	CTCACCTGGCTGAAGGACTAGCAC		-	-	-	-
BAC	Intron1			-	-	-	-
		GAGGCCTACCGGTTAATCACG					
Genomic	- 700-Intron1	GCGCCCTAGACCCTCTAATC	CGGCTGACAAAGGATGACC	1100 bp	59°C	1'20"	2,5µl
PCR	- 630	CAAGCATATACCTGTGACA		-	-	-	-
PCR	- 570		GCTAGGTTTCGAGCCTTGAGG	-	-	-	-
PCR	Exon1		ACCTTGGCTGAAGGACTAGCACGG	-	-	-	-
Genomic	- 570-Intron2	GCGGCCCCGGAAGGCGC	CACTCCGCAATGAGACTTACG	1000 bp	58°C	1'20"	2µl
PCR	-80	AAGGTTCSGGAGGCTTCTGGA		-	-	-	-
PCR	Exon1	CAGITGCCTCTGCGTCCCG		-	-	-	-
PCR	Exon1		TGACATCAACTGGCAATTTC	-	-	-	-
Genomic	Intron2-exon4	CGTAAGTCTCATTGCGGAGTG	CTCCTTTATTCTCCGCTCCTCCA	900 bp	58°C	1'	-
BAC	Intron3-Exon7	GCCTCAATCTCTGGACTTCC	CTTCTGTAGTTCTCCTTATC	1500 bp	55°C	1'30"	-
BAC	Exon7-	CATTAGAGGTGTGGTGGATTC	GTA CTG CACAAGGCTTAC	1200 bp	55°C	1'30"	-
	Intron10						
Genomic	Exon10-	ACAGGATCTACAGGATGAT	ACTAGCTCTGCTTTAGTGC	600 bp	58°C	1'	-
	Exon11						
cDNA	Exon1-Exon6	CAGITGCCTCTGCGTCCCG	TTCCA ACTGTCCTTCAACTG	1100 bp	52°C	1'	-
cDNA	Exon7-	CATTAGAGGTGTGGTGGATTC	TAGTGCTAAAAGTATCACAGTATC	1250 bp	55°C	1'20"	-
	Exon11						

The source of DNA used is indicated. Primers listed without PCR conditions were used only to sequence the DNA fragment directly from the BAC or from PCR products amplified with different primers (those above them).

Appendix 2. List of primers and probes used for performing the Real Time RT-PCR

<i>Gene</i>	<i>Primer and probes sequences</i>	<i>Concentration</i>	<i>Size</i>
<i>HSP90AA1</i>	F: 5' AGTCTGGAGGATCCCCAGACA 3'	300 nM	
	R: 5' GGGTCATCCTCGTCAATACCA 3'	300 nM	78 pb
<i>G6PDH</i>	F: 5' TGACCTATGGCAACCGATACAA 3'	300 nM	
(Garcia-Crespo et al 2005)	R: 5' CCGCAAAAGACATCCAGGAT 3'	300 nM	76 pb
<i>SDHA</i>	F: 5' CATCCACTACATGACGGAGCA 3'	300 nM	
(Garcia-Crespo et al 2005)	R: 5' ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA 3'	300 nM	90 pb
<i>18S rRNA</i>	F: 5' GGGAATCAGGGTTCGATTCC 3'	900 nM	
(Lyahyai et al 2006)	R: 5' GGGTCGGGAGTGCCTAATTT 3'	900 nM	
	P: FAM- TCCAAGGAAGGCAGCAGGCGC-TAMRA	150 nM	93 pb
<i>GAPDH</i>	F: 5' TCCATGACCACTTTGGCATCGT 3'	300 nM	
(Lyahyai et al 2006)	R: 5' GTCTTCTGGGTCGCAGTGA 3'	300 nM	
	P: FAM- AGGGACTTATGACCACTGTCCACGCC -TAMRA	150 nM	70 pb



VIII.4. ARTÍCULO *RPSA*

Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Serrano C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Serrano M (accepted) **Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (RPSA). Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response**

Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (*RPSA*).

Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response

ANE MARCOS-CARCAVILLA¹, JORGE H. CALVO², CARMEN GONZÁLEZ¹, CARMEN SERRANO⁵, KATAYOUN MOAZAMI-GOUDARZI³, PASCAL LAURENT³, MAUD BERTAUD³, HÉLÈNE HAYES³, ANNE E. BEATTIE⁴, JABER LYAHYAI⁵, INMACULADA MARTÍN-BURRIEL⁵, JUAN MARIA TORRES⁶ AND MAGDALENA SERRANO¹

¹ *Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra La Coruña Km 7.5, 28040, Madrid, Spain*

² *Unidad de Tecnología en Producción Animal, Avda. Montañana 930, CITA, 50059, Zaragoza, Spain*

³ *Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Département de Génétique Animale, INRA, Centre de Recherche de Jouy, 78352 Jouy-en-Josas, Cedex, France*

⁴ *AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand*

⁵ *Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain*

⁶ *CISA-INIA, Carretera de Algete a El Casar s/n, 28130,. Valdeolmos, Madrid, España*

E-mail : amarcos@inia.es

Fax: +34 913473783

Tel: +34 913572293

ABSTRACT

Scrapie is a prion disease affecting sheep and goats. Susceptibility to this neurodegenerative disease shows polygenic variance. The involvement of the laminin receptor (LRP/LR) in the metabolism and propagation of prions has previously been demonstrated. In the present work, the ovine laminin receptor gene (*RPSA*) was isolated, characterized and mapped to ovine chromosome OAR19q13. Real time RT-PCR revealed a significant decrease in *RPSA* mRNA in cerebellum after scrapie infection. Conversely, no differences were detected in other brain regions such as diencephalon and medulla oblongata. Association analysis showed that a polymorphism, reflecting the presence of a *RPSA* pseudogene, was over-represented in a group of sheep resistant to scrapie infection. No amino acid change in the LRP/LR protein was found in the 126 sheep analysed. However, interesting amino acid positions (241, 272 and 290), which could participate in the species barrier to scrapie and maybe to other TSEs, were identified by comparing LRP/LR sequences from various mammals with variable levels of resistance to scrapie.

INTRODUCTION

Scrapie (SC) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of sheep and goats. TSEs are neurodegenerative diseases caused by transmissible proteinaceous particles (prions) devoid of nucleic acid that affect various animal species, including man. The key event in the pathogenesis of prion diseases is the conversion of the host encoded and naturally expressed cellular prion protein (PrP^c) into its aberrant counterpart (PrP^{sc}). During the conversion process, PrP^{sc} acquires new biophysical and biochemical characteristics which cause its accumulation in the form of amyloid plaques in nervous and lymphoid tissues (Prusiner 1998).

In SC-infected cells, PrP^{Sc} seems to originate from a posttranslational refolding of PrP^C. Although the exact subcellular location of this process is unknown, rafts of the plasma membrane or the endocytic pathway have been invoked (Ben-Zaken et al. 2003). Transgenic studies on the species barrier have indicated that accessory molecules of the host are probably involved in this process. Thus, during recent years, the involvement of LRP/LR together with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) as cofactors/co-receptors, has been demonstrated, not only in PrP^C metabolism, but also in prion propagation (Adjou et al. 2003; Gauczynski et al. 2001; Gauczynski et al. 2006; Horonchik et al. 2005; Hundt et al. 2001; Leucht et al. 2003; Morel et al. 2005; Rieger et al. 1997; Vana and Weiss 2006).

Various isoforms corresponding to different maturation states of the non integrin laminin receptor LRP/LR (44, 60, 67 and 220 kDa) have been isolated from mouse brains and found to bind to PrP (Simoneau et al. 2003). The high affinity 67kDa LR is often referred to as the 32-67kDa LR (Kim et al. 1998) or the 37-67kDa LR (Rao et al. 1994). This discrepancy in terminology is due to the fact that cDNA clones of the 67kDa LR contain a sequence potentially coding for only the 32kDa polypeptide, while the translation product of the corresponding mRNA has a molecular mass of 37kDa and acts as a precursor (LRP) of the 67kDa LR (Shmakov et al. 2000). The process by which the 67kDa LR is assembled from the precursor is not yet understood. Several hypotheses have been proposed to explain this polymorphism (Castronovo et al. 1991; Hundt et al. 2001; Landowski et al. 1995), the most reliable one involves association of the 37kDa LRP with HSPGs (Hundt et al. 2001).

The 37kDa LRP protein is a component of the translational machinery since it is specifically associated with the 40S ribosomal subunit (Auth and Brawerman 1992) and it also seems to be involved in maintaining nuclear architecture by stabilizing chromatin via multiple associations with proteic and nucleic acid components of the nucleosome (Kinoshita et al. 1998). Thus, this isoform is mainly localized in the cytoplasm (Yenofsky et al. 1982) and in the nucleus (Yow et al. 1988). In addition, the 67kDa LR can be present as a laminin binding protein on the cell

surface (Rabacchi et al. 1990) or in a free form in the extracellular matrix (Karpatova et al. 1996).

Susceptibility to SC is associated with polymorphisms in the amino acid sequence of the PrP protein. To date, twenty-five polymorphic codons and 40 haplotypes have been described in the open reading frame of the gene encoding the PrP (*PRNP*) (Goldmann et al. 2005). In a slightly simplified assessment of the genetic susceptibility of a sheep to develop SC, polymorphisms are classified according to amino acid changes at positions V136A, R154H, and QH171R (Baylis et al. 2004). However, additional evidence for other genomic regions containing genes that influence the incubation period for SC in mice (Lloyd et al. 2001; Lloyd et al. 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003b; Stephenson et al. 2000) and sheep (Moreno et al. 2003a) have been reported. Thus, a reasonable hypothesis is that a major gene (*PRNP*) controlling resistance/susceptibility to SC, coexists with a number of other genes that modulate its effect.

Furthermore, transmission of prions from one species to another is usually inefficient and accompanied by a prolonged incubation time. Among the few animal species that appear to be resistant to oral infection by the TSE agent are rabbits, dogs and pigs (Knorr et al. 2007; Lysek et al. 2005; Vorberg et al. 2003). The resistance to prion infection is a characteristic of the host species, and the PrP amino acid sequence of both the donor and recipient animals plays an important role (Castilla et al. 2004; Vorberg et al. 2003). Nevertheless, the involvement of additional factors, other than PrP, is also possible. In several model systems, both the species-specific formation of PrP^{sc} and the transmission of the TSE agent across species barriers have been mapped to the central region of the PrP molecule comprising residues 108 to 171 (Kocisko et al. 1995; Priola et al. 1994; Scott et al. 1993). This region includes the direct binding domain (aa 144-179) to LRP/LR (Hundt et al. 2001), highlighting a putative role of the LRP/LR on TSE species barrier.

This information has led us to study the gene encoding the LRP/LR (*RPSA*, derived from the approved name at HGNC, ribosomal protein SA) as a possible candidate contributing to ovine

SC. The first objective of this work was to determine the position of the *RPSA* gene on the ovine genome in order to verify if its localization was in concordance with previous reports describing QTLs associated with resistance/susceptibility and incubation period for different TSEs in ovine (Moreno et al. 2003a) and murine models (Lloyd et al. 2001; Lloyd et al. 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003b; Stephenson et al. 2000). The next step was to verify if there was any difference in the expression of this gene between SC infected and uninfected sheep presenting the same genotype for PrP (*ARQ/ARQ*). This comparison was performed using real time RT-PCR in various brain regions. Finally, the *RPSA* polymorphism was studied in order to perform association analyses to identify putative mutations in the ovine *RPSA* locus that could explain, at least in part, the polygenic response to SC in sheep. The possible role of LRP/LR in SC and other TSEs species barrier is also discussed.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of sheep specific DNA fragments

Genomic DNA was extracted from ovine lymphocytes according to the salting out procedure (Miller et al. 1988). BAC DNA was purified by a Maxipreparation with the Nucleobond PC 100 Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

It is widely recognized that, in mammals, a single gene, *RPSA*, encodes the LRP/LR protein. Nevertheless, the existence of numerous *RPSA* pseudogenes has greatly hindered the sequencing and mapping of this gene in all the mammalian species studied. Thus, in order to isolate and sequence the ovine *RPSA* gene, twenty heterologous primers derived from the human (GenBank HSU43901 and BC071968) and bovine sequences (GenBank NW_930073 and BC102490), and twenty-one specific primers based on the sequence of the ovine fragments previously isolated with the primers described above, were synthesized. Appendix 1 shows only the primer pairs that were useful to isolate *RPSA* ovine sequences. The correct identity of amplified fragments from genomic DNA was confirmed by sequencing a BAC, containing the ovine *RPSA* gene, which

was isolated from the ovine BAC library at INRA (Jouy-en-Josas, France) (Vaiman et al. 1999). Genomic (60-100 ng) and BAC DNA (100 ng) were amplified in a final volume of 25 µl containing 0.5 µM of each primer, 200 µM of dNTPs, 1.5 – 2 mM MgCl₂, 2.5 µl of 10x buffer MgCl₂ free (Biotools) and 1U Taq polymerase (Biotools). The following PCR conditions were used: denaturation at 94°C for 5 min, 30 amplifications cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at temperatures between 50°C to 66°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s to 1 min 45 s followed by a final 5-10 min extension at 72°C. Primer pairs and their amplification conditions are shown in Appendix 1. The resulting PCR fragments were purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) and bi-directionally sequenced with the PCR primers. The identity of the fragments was confirmed by BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Additional informatics programs such as “Neural Network Promoter Prediction” (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), “CISTER” (<http://zlab.bu.edu/%7Emfrith/cister.shtml>), “Signal Scan” (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/signal/>), “TFSEARCH” (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) and “TargetScan” (<http://www.targetscan.org/>), were used in order to study the promoter and look for possible transcriptional and translational regulatory elements.

Chromosomal location

Ovine *RPSA* gene was localized on the ovine genome by two approaches: cytogenetic and genetic mapping.

Cytogenetic mapping: In order to avoid possible co-amplifications with pseudogenes, a pair of primers hybridizing with the *RPSA* intron 4 (see Appendix 1) was used to screen the ovine BAC library mentioned above (Vaiman et al. 1999). DNA from the identified BAC clone was labelled by nick-translation in the presence of biotin-14-dATP (BioNick TM 18247-015 labelling system)

and used as probe for in situ hybridisation on RBP-banded ovine chromosome preparations according to the protocol described by Hayes and co-workers (1991).

Genetic mapping: The cytogenetic localization was confirmed by linkage mapping in nine sheep families (129 animals). *RPSA* gene was mapped against markers on the sheep framework map (Maddox et al. 2001). Multipoint linkage analysis of the International Mapping Flock (IMF) pedigrees (Crawford et al. 1995) was performed using CRI-MAP (Lander and Green 1987). Thus, genomic DNA from five domestic sheep breeds (Latxa (n=3), Manchega (n=4), Awassi (n=2), Assaf (n=2) and Rasa Aragonesa (n=2)) was amplified and sequenced as previously described and analyzed using CHROMAS 1.43 and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) software in order to detect polymorphisms along the isolated sequences of the ovine *RPSA* gene. In this case, neither their *PRNP* genotype nor their pattern of SC resistance/susceptibility was taken into account. Animals were chosen from different breeds to avoid any problem due to allele fixation because of the selective status of these breeds in our country (Spain), and to identify a representative polymorphism at the species level.

In order to follow the distribution of the gene within the pedigrees of the AgResearch IMF, the C/T transversion located at position 69 in the *RPSA* exon 6 was analyzed by PCR-RFLP using primers that hybridized with *RPSA* exon 5 and exon 6 (see Appendix 1). The reaction product (8 µl) was digested with 0.2 U of *Ava*II at 37°C for 4 hours in a final volume of 18 µl and then electrophoresed on a 3.5% agarose gel for visualization.

Gene expression

Thirteen Rasa Aragonesa female sheep (aged 3–5 years) with the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*) were included in this study. Eight animals, which exhibited clinical signs of SC in a terminal state, came from a closed regulatory monitored flock and from the Spanish Scrapie surveillance program, and were kindly provided by the Prion Research Centre of the University of Zaragoza. Control animals (n = 5) were selected from a different flock belonging to the same

breed, where no SC has been reported to date. The aim of this sample design was to determine if SC disease might cause any change in the expression pattern of *RPSA* in sheep.

After sacrificing the animals by intravenous injection of sodium pentobarbital and exsanguination, small fragments of medulla oblongata, cerebellum, diencephalon and prefrontal cortex were included in RNAlater (Ambion). Total mRNA was purified with the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of each RNA preparation using random hexamer primers with the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Gene expression levels were subsequently determined by real time RT-PCR using primers hybridizing with ovine *RPSA* exons 5 and 6. All real time RT-PCR reactions were run in triplicate. Three tissue specific housekeeping genes were used to normalize each set of results. Thus, following Vandesompele and co-workers (2002) suggestions, data were normalized for Hexose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and β -actin (*ACTB*). Primers and probes used for gene expression analysis, their concentrations and amplicon sizes are shown in Appendix 2. Amplifications were carried out in a final volume of 10 µl containing SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) or TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems), depending on the gene analyzed (see Appendix 2). After preheating the mix at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 30 s were carried out.

The threshold cycle values were transformed into raw quantity values and normalized according to the procedure described by Garcia-Crespo and co-workers (2005). Finally, a paired-sample comparison was performed in order to contrast the mean of the differences in *RPSA* mRNA expression among the four tissues analysed in each individual. Additionally, the means from SC infected and control animals were compared with a T-test.

Polymorphism detection and association analysis

It is well established that there are significant differences among breeds in which *PRNP* genotypes are attacked by SC. For instance, the *ARQ/ARQ* genotype shows different levels of resistance to SC infection depending on the breed studied (Baylis et al. 2004). However, although most of the additional amino acid polymorphisms, located between aa 101 and aa 241 in the PrP, have been found on the ARQ haplotype, there is no evidence of any correlation between the occurrence of a specific *ARQ* haplotype and the SC disease status of a flock (Goldmann et al. 2005).

The existence of two binding sites for PrP on the LRP/LR has been reported: a direct one located between amino acid 161-179, and a putative second HSPG-dependent PrP binding domain between amino acid 180-285 of the LRP/LR. It is conceivable that one of the major sources of variability in SC resistance/susceptibility and/or incubation period originating from LRP/LR might be due to differences in the amino acids involved in the LRP/LR-PrP^c/PrP^{sc} interaction.

Since the genomic region encoding amino acids 161-285 of the LRP/LR expands from the last 18 nucleotides of the *RPSA* exon 4 to the end of the coding region in exon 7, two PCR reactions were carried out using primers hybridizing with exons 4 and intron 4, and intron 4 and exon 7 (see Appendix 1). Thus, genomic DNA from 84 adult, *ARQ/ARQ*, Rasa Aragonesa breed sheep, was examined and used to perform association analyses. All these animals belonged to seven flocks of sheep where natural SC was detected, conserved for research purposes by the Prion Research Centre of the University of Zaragoza. Thirty-three of them (infected) exhibited clinical and immunohistochemical signs of SC, while the remaining 51 (healthy), despite pertaining to a flock where SC was detected, did not. This flock was different from those of the infected animals. No PrP^{sc} or clinical signs were detected in these 51 animals, nevertheless, the possible appearance of infection signs with longer incubation periods cannot be ruled out. In order to determine if the polymorphism pattern found in these 84 animals was exclusive or not of the Rasa Aragonesa group, an additional genotyping of 42 *ARQ/ARQ* sheep belonging to the

Manchega (n=35) and Assaf (n=7) breeds, which had no previous contact with SC, was carried out.

Finally, association analysis was performed with the CATMOD procedure of the SAS statistical package (SAS, 1998), which is a procedure for categorical data modelling. In this case, since there were only two response levels, the standard response function (generalized logits) was adopted using the maximum likelihood estimation method. The analysis took into account responses (presence/absence of clinical signs) to SC as the dependent variable and the genotypes for the SNPs tested as the independent factor.

Interspecies amino acid sequence comparison

In order to check if there was any important variation that could explain the different levels of resistance to prion infection, which depends both on host species and prion origin, LRP/LR amino acid sequences from several mammals displaying different responses to SC agent, were compared.

Thus, mRNA from the spleen of a white New Zealand rabbit was retrotranscribed, amplified and bidirectionally sequenced with the aim of predicting the protein sequence encoded by the mRNA. The heterologous primer pairs used hybridized with *RPSA* exon 2 and 7. Rabbit RNA (200 ng) was retrotranscribed and amplified in a final volume of 50 µl containing 0.5 µM of each primer, 200 µM of dNTPs, 2 mM MgCl₂, 5 µl of 10x buffer MgCl₂ free (Biotools), 4U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 2U RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega) and 1U Taq polymerase (Biotools). Retrotranscription (RT) and touchdown PCR (TD-PCR) were performed as follows: an initial step at 42°C for 45 min, followed by 95°C for 10 min for the RT. Next, the TD-PCR was carried out with nine cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at variable temperatures and extension at 72°C for 1 min 10 s. In the first cycle, the annealing temperature was set to 60°C, and for each of the eight subsequent cycles the annealing

temperature was decreased by 1°C. Then, after 5 min at 95°C, 34 cycles at 95°C for 45 s, 50°C for 30 s and 72°C for 1 min 10 s were performed followed by a final step at 72°C for 10 min.

Finally, the LRP/LR amino acid sequences from mouse (P14206 and NP_035159), rat (NP_058834.1), hamster (P38982), man (P00865), cattle (P26452), pig (NP_00103222.1), cat (Scaffold_214833), and dog (NW_876276), deposited in GenBank, together with the ovine (EF394773 and EF222474) and rabbit (EF222437) ones inferred in the present work, were compared with the Clustalw program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

RESULTS

Isolation of the ovine *RPSA* gene and polymorphism detection

Due to the presence of *RPSA* pseudogenes, big efforts were necessary to deciphered the ovine *RPSA* gene sequence. Finally, with the exception of intron 3, which covers 9 kb in cattle, the sequence of the ovine *RPSA* gene was determined, including part of both the 5' and 3' flanking regions (Fig. 1 and GenBank accession numbers EF222474 and EF394773).

The structure of the ovine *RPSA* gene was inferred by comparison between the genomic and cDNA sequences from sheep, man and cattle (EF394773, EF222474, U43901 and BC102490, respectively). Thus we could confirm that the ovine gene is split into seven exons ranging in size from around 50 (exon 1) to 246 nucleotides (exon 4). The presence of two small nucleolar RNAs (snoRNA) within ovine *RPSA* exons 2 and 4 (ACA6 and E2, respectively) was also corroborated. The precise length and full sequence of each of them are shown in Fig. 1 and GenBank accession number EF394773. The entire exon 1 and the beginning of exon 2 (33 bases) are untranslated sequences. The ATG codon, described as the translational start, is located 133 bases upstream from the end of exon 2. The splicing donor and acceptor sites follow the classical rule with AG/GT nucleotides, respectively, ending and starting successive introns. However, in two cases, obedience to this rule implies the existence of split codons: the first one between

exons 2 and 3 encoding a glycine and the second one between exons 6 and 7 corresponding to a glutamic acid.

The existence of various transcription start points have been described in other species (Jackers et al. 1996; Clausse et al. 1996; and GenBank accession numbers NM_001012321 and NM_002295). In order to determine the transcription initiation site in sheep, the ovine sequence (EF394773) was compared with previously reported sequences from cattle and man (BC102490 and U43901 respectively). Furthermore, the promoter prediction program “Neural Network Promoter Prediction” was used. As a result, four possible transcription start points were identified, thus ovine exon 1 might cover 52 bp (Fig. 1B and Fig. 2A).

In addition to the coding region, a sequence of 350 bp corresponding to the 5' flanking region of the ovine *RPSA* gene was also analysed. Possible *cis*-regulatory elements were inferred in the region between positions -350 and +1398 (Fig. 2). Potential SP-1, AP-1 and AP-2 sites were predicted with the CISTER, Signal Scan and TFSEARCH programs. Additionally, a metal responding element (Simons and Toomre 2000), previously described in the chicken and human *RPSA* genes (Clausse et al. 1996; Jackers et al. 1996), was also identified. Contrary to these previous works, possible TATA and CCAAT boxes were predicted *in silico*. The TargetScan program was used in an attempt to find possible targets for microRNAs that could be involved in the posttranscriptional regulation of ovine *RPSA* gene. Several putative targets were detected along the mRNA sequence (Fig. 1).

By comparing sequences from Latxa, Manchega, Awassi, Asaff and Rasa Aragonesa sheep breeds, twenty-seven polymorphic sites were identified within the isolated fragments (see GenBank accession numbers EF222474 and EF394773). Although nine of them were located within exons 2, 3, 4, 6 and 7, none of these alternatives produced any change in the amino acid sequence. The remaining eighteen were spread along ovine *RPSA* introns 1, 2, 4, 5 and 6. Interestingly, as shown in Fig. 1, the A/G transitions at positions 198 and 96 in exons 4 and 7, respectively, could affect possible microRNA targets.

Chromosomal localization of ovine *RPSA* gene

The ovine *RPSA* gene was mapped to OAR19q13 by FISH using the ovine BAC library (Vaiman, 1999) at INRA-CRJ (Jouy-en Josas, France). These results were confirmed by linkage mapping using the IMF pedigrees. The best supported linkage map of the relevant region of chromosome 19 including the *RPSA* gene is shown in Fig. 3 and was obtained by CRI-MAP multipoint analysis, after performing the two-point and flips options. The ovine *RPSA* gene was located, with the most likely position being between *CSSM06* ($r = 0.04$, two-point LOD score = 18.97) and *-2HF3B* ($r = 0.10$, two-point LOD score = 13.46) markers.

Gene expression analyses

The expression of *RPSA* was studied by real time RT-PCR in several brain regions including medulla oblongata, cerebellum, diencephalon and prefrontal cortex, from five control and eight SC infected *ARQ/ARQ* Rasa Aragonesa breed sheep (Fig. 4). The paired-sample comparison among tissues revealed significant differences between prefrontal cortex and medulla oblongata ($p=0.00248$), prefrontal cortex and diencephalon ($p=0.00005$), cerebellum and medulla oblongata ($p=0.02745$), cerebellum and prefrontal cortex ($p=0.00109$), and cerebellum and diencephalon ($p=0.00104$). In contrast, no differences were observed between diencephalon and medulla oblongata ($p>0.05$). On the other hand, significant differences in the expression of *RPSA* between SC infected and control animals were found in cerebellum ($p=0.00585$). Conversely, no differences were detected ($p>0.05$) in the rest of the nervous tissues studied.

Polymorphism detection and association analysis

Eight polymorphic sites were identified within the 84 Rasa Aragonesa breed animals, in the *RPSA* region encoding the two binding domains for PrP, at positions 198 in exon 4, 27 and 29 in intron 4, 10 in intron 5, 69 and 165 in exon 6, 9 in intron 6 and 96 in exon 7 (Fig. 1 and GenBank sequence EF394773). Sequencing of the region between exon 4 and intron 4 of various animals

provided confusing data. After many assays using different combinations of primer pairs, the existence of a non-processed pseudogene co-amplifying with the ovine *RPSA* gene, and lacking the G at position 29 in intron 4 of the ovine gene, was confirmed (see an extended explanation in Appendix 3). Additionally, the SNPs located in exons 4, 6 and 7 were silent, and the SNP in intron 5 was poorly represented (0,6%). Thus, only the SNPs at positions 29 and 9 in introns 4 and 6, respectively, were tested in the association analysis. The Chi-square test among maximum likelihood estimations of the genotypes for the polymorphisms in introns 4 and 6 (positions 29 and 9, respectively) were significant only for the insertion/deletion variation ($p=0.0177$). Thus, 59.5% of the Rasa Aragonesa breed sheep had a heterozygous genotype (+/-) for the insertion/deletion polymorphism at position 29 in the ovine *RPSA* intron 4, indicative of the presence of the pseudogene. The distribution of this polymorphism among the 84 Rasa Aragonesa breed sheep analysed in the association test is shown in Table 1. The Chi-square test (4.465) for the contingency Table 1, indicates a significant association ($p=0.035$) between the presence/absence of the pseudogene and the resistance/susceptibility to SC. Thus, the pseudogene is present, at least in one copy, in 68.6% and 45.4% of the healthy and infected Rasa Aragonesa breed sheep, respectively.

Interspecies amino acid sequence comparison

We decided to compare the LRP/LR amino acid sequences of various mammals presenting different susceptibilities to prion infection (Knorr et al. 2007; Lysek et al. 2005; Vorberg et al. 2003), in order to check if amino acid changes could account for this variable response. Thus, rabbit *RPSA* cDNA was isolated and sequenced (GenBank accession number EF222473). This rabbit cDNA fragment included the region encoding both the direct (161-179) and the putative indirect (180-285) binding domains of the LRP/LR to the PrP suggested by Hundt and co-workers (2001). The rest of the LRP/LR sequences that are represented in Fig. 5A are derived from nucleotide and amino acid sequences that were previously deposited in the GenBank

database. As shown in Fig. 5, little variation exists within all the sequence. Positions 241, 272 and 290 seem to be the only locations varying considerably among the species examined (A241T; A272TS and A290T). In particular, positions 241 and 272 are of special interest for affecting the indirect binding domain to PrP. The different amino acid combinations at these positions in the LRP/LR sequence for the species analysed are summarized in Fig. 5B. In this regard, Creighton (1992) determined that, along a peptide sequence, alanine is most commonly located in the alpha-helix, whereas threonine seems to have preference for the beta-helix and serine for the coiled regions. The possible role of these changes is discussed in the section below.

Discussion

Our first efforts to isolate the ovine *RPSA* sequence from genomic DNA were unsuccessful but when ovine cDNA samples and a BAC containing the ovine gene became available, we could characterize the entire sequence of the ovine *RPSA* gene with the exception of intron 3 (see Fig. 1 and GenBank accession numbers EF222474 and EF394773). Four possible translational start sites were identified (Fig. 1B and Fig. 2A). Nevertheless, additional experiments need to be performed in order to determine the exact transcription start point. Besides, several transcriptional and posttranscriptional regulatory sequences were also predicted (Fig. 1C, 1D and Fig. 2). Furthermore, as previously reported in man (Jackers et al. 1996; Selvamurugan and Eliceiri 1995; and GenBank accession numbers HUMSNE21X, AF375472, AJ609429 and HSU43901), the localization of the ACA6 and E2 snoRNAs, required for processing ribosomal RNA precursors (Kiss et al. 2004; Nag et al. 1993; Selvamurugan and Eliceiri 1995), within ovine *RPSA* introns 2 and 4, respectively, was also determined. Although ovine intron 3 was not sequenced in the present work, it is known that its human and bovine orthologs cover 2 and 9 kb, respectively. The possible importance of the two Alu sequences contained within the *RPSA* intron 3 has been discussed by Jackers and co-workers (Jackers et al. 1996).

The localization of ovine *RPSA* gene on OAR19q13, between *CSSM06* and *-2HF3B* loci (Fig. 2), is consistent with comparative mapping information since this gene maps to human chromosome 3 and mouse chromosome 9. It should be noted that murine chromosome 9 has already been reported as a chromosome containing a QTL region involved in incubation period to SC (Moreno et al. 2003b), but the *RPSA* locus is outside the significant interval related with this character.

Despite all the sheep analysed in the expression analysis belonging to the same breed (Rasa Aragonesa) and *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*), real time RT-PCR results reflected a high individual variability (Fig 4), which could be explained by the presence of different strains, or a combination of, different dose, route, duration and time of infection. These factors could not be controlled, since the animals studied here were all field cases. Expression results revealed that, independently of the disease status, medulla oblongata and diencephalon showed between 3 and 6 times less mRNA than cerebellum and prefrontal cortex, respectively. When comparing SC infected and control sheep, a significant decrease in *RPSA* mRNA was observed in the cerebellum of infected animals ($p < 0.01$) (Fig. 4). Previous studies reported that medulla oblongata and diencephalon were the brain areas where more PrP^{sc} deposition and neuronal damage was observed in *ARQ/ARQ* SC infected sheep (Caplazi et al. 2004; Ligios et al. 2002; Vidal et al. 2006) This finding could be interpreted attending to the different rate of LRP/LR production in different brain regions, which could be related with the possible involvement of LRP/LR, in combination with PrP^c and laminin, in the neurodegeneration process as proposed Baloui and co-workers (2004). Nevertheless, the existence of *RPSA* pseudogenes which could be transcribed has to be considered. So, further expression analysis would be necessary to determine if the overexpression of *RPSA* detected in the present work is due either to the regulation of the *RPSA* functional gene or one or more *RPSA* pseudogene(s).

On the other hand, inter-individual differences in the production, accumulation at the cell surface and/or shedding to the extracellular space of LRP/LR, as well as differences at the LRP/LR

amino acid sequence affecting the interaction with the PrP^{Sc}, could be responsible for the variable responses to SC infection. Thus, we decided to look for polymorphism in the regions involved in the LRP/LR-PrP^C/PrP^{Sc} interaction. Since all the mutation found in this region were silent they are not supposed to have any effect on the binding domains to PrP^C/PrP^{Sc}.

However, the genotyping of the segment between exon 4 and intron 4 revealed the presence of a *RPSA* non-processed pseudogene in almost 60% of the sheep analysed. Association analysis revealed that the polymorphism at position 29 in intron 4 was overrepresented ($p < 0.05$) in the group of sheep that, despite being in contact with the SC agent, did not develop the disease (Table 1). Nevertheless, due to the reduce sample size, these results should be cautiously considered. In this way, the existence of pseudogenes playing biological functions has been described (Balakirev and Ayala 2003; Hirotsune et al. 2003). So, animals bearing the pseudogene may have some advantage when they are exposed to SC because, for instance, the pseudogene might help in the regulation of the functional gene. This fact would explain why the *RPSA* locus is outside the QTL intervals related with the SC incubation period described to date. Thus it would be interesting to map this pseudogene in sheep in order to check if its location corresponds to any previously described QTL region related to incubation period and/or resistance/susceptibility to SC (Moreno et al. 2003a).

On the other hand, the transmission of the TSE agent, from one species to another, appears to be dependent on the amino acid sequence homology between the host PrP^C and the exogenous PrP^{Sc} (Vorberg et al. 2003). Nonetheless, as the involvement of additional factors cannot be ruled out, we have compared the LRP/LR amino acid sequences from various mammals, including dog, pig and rabbit. The aim of this comparison was to check if there was any important variation along the LRP/LR sequence that could explain the absence of literature reporting natural prion infection in any of these three species.

As shown in Fig. 5, little variation exists among these sequences. Although substitutions at positions 241, 272 and 290 are within or close to the putative indirect binding domain to

PrP^c/PrP^{sc} (aa 180-285), alteration of the global structure of the interaction site is not expected (Knorr et al. 2007). However, it is possible that the different combinations of amino acids through the LRP/LR sequence may modify its specificity with other proteins affecting the interaction between the LRP/LR from one species and prions from different origins, strengthening or weakening the species barrier. For instance, Fig. 5B suggests that the presence of a threonine at amino acid 241 of the LRP/LR protein confers resistance to SC infection. Nevertheless, it is known that the critical determinant in a protein function and interactions with its ligands, is its overall tertiary structure. Unfortunately, the only way to check how these amino acid changes could affect the interaction between LRP/LR with different prion strains is performing structural investigations applying crystallographic and/or nuclear magnetic resonance techniques that were outside the scope of this study.

In the present work, the ovine *RPSA* gene was isolated and characterized. Its organization and localization agree with the data available in other species. Real time RT-PCR results revealed changes in the expression of *RPSA* after natural SC infection in specific central nervous system regions indicating its possible involvement in TSE related neurodegeneration. We suggest that it may be the presence of a *RPSA* non-processed pseudogene, and not the variation in the ovine LRP/LR amino acid sequence, which could explain the susceptibility differences to SC among sheep with the same *PRNP* genotype. However, the possible involvement of this receptor in the species barrier to SC and other TSEs should not be discarded. In any case, further studies are required to confirm the results presented here and to examine the existence of polymorphisms at regions affecting the gene and protein regulation and processing, and the possible involvement of ovine *RPSA* pseudogenes in the incubation period to SC in sheep.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CERSYRA-Valdepeñas and AGRAMA breeders association, CSIC-León, CITA-Aragón, Prion Research Centre of the University of Zaragoza–, INIA-Madrid and ETSIA-Polytechnique University of Madrid for kindly providing Manchega, Awassi, Assaf, Rasa Aragonesa and rabbit samples. We are very grateful to Dr. C. Mansilla and Dr. F. Ponz for helping us with the RT-PCR improvement, to Dr. K.G. Dodds for his English correction of the manuscript, to Dr. M.E.F. Alves for her continuous help and to Dr. E.P. Cribiu and Dr. P. Zaragoza for allowing us to perform the cytogenetic mapping and the expression analysis in their respective laboratories. This work was supported by the RTA2006-00104 INIA project, and a Predoctoral Grant from the INIA.

REFERENCES

- Adjou KT, Simoneau S, Sales N, Lamoury F, Dormont D, Papy-Garcia D, Barritault D, Deslys J-P, Lasmezas CI (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* 84, 2595-2603
- Asano Y, Takashima S, Asakura M, Shintani Y, Liao Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogai A, Fukushima T, Oikawa Y, Okazaki Y, Kaneda Y, Sato M, Miyazaki J, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M, Hori M (2004) Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-130
- Auth D, Brawerman G (1992) A 33-kDa Polypeptide with Homology to the Laminin Receptor: Component of Translation Machinery. *PNAS* 89, 4368-4372
- Balakirev ES, Ayala FJ (2003) Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu Rev Genet* 37, 123-151
- Baloui H, von Boxberg Y, Vinh J, Weiss S, Rossier J, Nothias F, Stettler O (2004) Cellular prion protein/laminin receptor: distribution in adult central nervous system and characterization of an isoform associated with a subtype of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 20, 2605-2616
- Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Goldmann W, Smith A, Sivam K, Tongue S, Gravenor MB (2004) Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J Gen Virol* 85, 2735-2740
- Ben-Zaken O, Tzaban S, Tal Y, Horonchik L, Esko JD, Vlodavsky I, Taraboulos A (2003) Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J Biol Chem* 278, 40041-40049

Caplazi P, O'Rourke K, Wolf C, Shaw D, Baszler TV (2004) Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest* 16, 489-496

Castilla J, Gutierrez-Adan A, Brun A, Doyle D, Pintado B, Ramirez MA, Salguero FJ, Parra B, Segundo FDS, Sanchez-Vizcaino JM, Rogers M, Torres JM (2004) Subclinical Bovine Spongiform Encephalopathy Infection in Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein. *J. Neurosci.* 24, 5063-5069

Castronovo V, Claysmith AP, Barker KT, Cioce V, Krutzsch HC, Sobel ME (1991) Biosynthesis of the 67 kDa high affinity laminin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 177-183

Clausse N, Jackers P, Jares P, Joris B, Sobel ME, Castronovo V (1996) Identification of the active gene coding for the metastasis-associated 37LRP/p40 multifunctional protein. *DNA Cell Biol* 15, 1009-1023

Creighton TE (1992) Protein folding pathways determined using disulphide bonds. *Bioessays* 14, 195-199

Garcia-Crespo D, Juste R, Hurtado A (2005) Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research* 1, 3

Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 20, 5863-5875

Gauczynski S, Nikles D, El-Gogo S, Papy-Garcia D, Rey C, Alban S, Barritault D, Lasmezas CI, Weiss S (2006) The 37-kDa/67-kDa Laminin Receptor Acts as a Receptor for Infectious Prions and Is Inhibited by Polysulfated Glycanes. *J Infect Dis* 194, 702-709

Goldmann W, Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Hunter N (2005) Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1294-1302

Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K-i, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423, 91-96

Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodavsky I, Taraboulos A (2005) Heparan Sulfate Is a Cellular Receptor for Purified Infectious Prions. *J. Biol. Chem.* 280, 17062-17067

Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J* 20, 5876-5886

Jackers P, Clausse N, Fernandez M, Berti A, Princen F, Wewer U, Sobel ME, Castronovo V (1996) Seventeen copies of the human 37 kDa laminin receptor precursor/p40 ribosome-associated protein gene are processed pseudogenes arisen from retropositional events. *Biochim Biophys Acta* 1305, 98-104

- Karpatova M, Tagliabue E, Castronovo V, Magnifico A, Ardini E, Morelli D, Belotti D, Colnaghi MI, Menard S (1996) Shedding of the 67-kDa laminin receptor by human cancer cells. *J Cell Biochem* 60, 226-234
- Kim WH, Lee BL, Jun SH, Song SY, Kleinman HK (1998) Expression of 32/67-kDa laminin receptor in laminin adhesion-selected human colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 77, 15-20
- Kinoshita K, Kaneda Y, Sato M, Saeki Y, Wataya-Kaneda M, Hoffmann A (1998) LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 277-282
- Kiss AM, Jady BE, Bertrand E, Kiss T (2004) Human Box H/ACA Pseudouridylation Guide RNA Machinery. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5797-5807
- Knorr C, Beuermann C, Beck J, Brenig B (2007) Characterization of the porcine multicopy ribosomal protein SA/37-kDa laminin receptor gene family. *Gene* 395, 135-143
- Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Jr., Caughey B (1995) Species Specificity in the Cell-Free Conversion of Prion Protein to Protease-Resistant Forms: A Model for the Scrapie Species Barrier. *PNAS* 92, 3923-3927
- Lander ES, Green P (1987) Construction of Multilocus Genetic Linkage Maps in Humans 10.1073/pnas.84.8.2363. *PNAS* 84, 2363-2367
- Landowski TH, Dratz EA, Starkey JR (1995) Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry* 34, 11276-11287
- Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S (2003) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4, 290-295
- Ligios C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM (2002) Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol* 127, 45-57
- Lyahyai J, Bolea R, Serrano C, Eva Monleón, Carlos Moreno, Rosario Osta, Pilar Zaragoza, Juan J. Badiola and Inmaculada Martín-Burriel (2006) Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 112: 451-460.
- Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *PNAS* 102, 640-645
- Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, Targonski P, Collinge J, Fisher EM (2001) Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6279-6283
- Lloyd SE, Uphill JB, Targonski PV, Fisher EM, Collinge J (2002) Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics* 4, 77-81

Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP, Freking BA, Beh KJ, Cockett NE, Kang N, Riffkin CD, Drinkwater R, Moore SS, Dodds KG, Lumsden JM, van Stijn TC, Phua SH, Adelson DL, Burkin HR, Broom JE, Buitkamp J, Cambridge L, Cushwa WT, Gerard E, Galloway SM, Harrison B, Hawken RJ, Hiendleder S, Henry HM, Medrano JF, Paterson KA, Schibler L, Stone RT, van Hest B (2001) An Enhanced Linkage Map of the Sheep Genome Comprising More Than 1000 Loci. *Genome Res.* 11, 1275-1289

Manolakou K, Beaton J, McConnell I, Farquar C, Manson J, Hastie ND, Bruce M, Jackson IJ (2001) Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *PNAS* 98, 7402-7407

Mariottini P, Amaldi F (1990) The 5' untranslated region of mRNA for ribosomal protein S19 is involved in its translational regulation during *Xenopus* development. *Mol. Cell. Biol.* 10, 816-822

Miller S, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215

Morel E, Andrieu T, Casagrande F, Gauczynski S, Weiss S, Grassi J, Rousset M, Dormont D, Chambaz J (2005) Bovine Prion Is Endocytosed by Human Enterocytes via the 37 kDa/67 kDa Laminin Receptor. *Am J Pathol* 167, 1033-1042

Moreno CR, Cosseddu GM, Andreoletti IO, Schibler L, Roig A, Moazami-Goudarzi IK, EYychenne F, Lajous D, Schelcher F, Cribiu EP, Vaiman D, Elsen JM (2003a) Identification of quantitative trait loci (QTL) modulating prion incubation period in sheep. (Identification de QTL affectant la durée d'incubation de la tremblante chez les ovins.). (Toulouse: Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat)

Moreno CR, Lantier F, Lantier I, Sarradin P, Elsen JM (2003b) Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165, 2085-2091

Nag MK, Thai TT, Ruff EA, Selvamurugan N, Kunnimalaiyaan M, Eliceiri GL (1993) Genes for E1, E2, and E3 Small Nucleolar RNAs. *PNAS* 90, 9001-9005

Priola SA, Caughey B, Race RE, Chesebro B (1994) Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells. *J. Virol.* 68, 4873-4878

Prusiner SB (1998) Prions. *PNAS* 95, 13363-13383

Rabacchi SA, Neve RL, Drager UC (1990) A positional marker for the dorsal embryonic retina is homologous to the high-affinity laminin receptor. *Development* 109, 521-531

Rao M, Manishen WJ, Maheshwari Y, Sykes DE, Siyanova EY, Tyner AL, Weiser MM (1994) Laminin receptor expression in rat intestine and liver during development and differentiation. *Gastroenterology* 107, 764-72.

Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 3, 1383-1388

SAS Institute Inc., SAS/STAT® Users's Guide, version 6, Fourth Edition, Volume1, Cary, NC:, 1989.

Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB (1993) Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-988

Selvamurugan N, Eliceiri GL (1995) The gene for human E2 small nucleolar RNA resides in an intron of a laminin-binding protein gene. *Genomics* 30, 400-401

Shmakov AN, Bode J, Kilshaw PJ, Ghosh S (2000) Diverse patterns of expression of the 67-kD laminin receptor in human small intestinal mucosa: potential binding sites for prion proteins? *J Pathol* 191, 318-322

Simoneau S, Haik S, Leucht C, Dormont D, Deslys JP, Weiss S, Lasmezas C (2003) Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP. *Biol Chem* 384, 243-246

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39

Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA (2000) Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* 69, 47-53

Vaiman D, Billault A, Tabet-Aoul K, Schibler L, Vilette D, Oustry-Vaiman A, Soravito C, Cribs EP (1999) Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mamm Genome* 10, 585-587

Vana K, Weiss S (2006) A trans-dominant negative 37kDa/67kDa laminin receptor mutant impairs PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *J Mol Biol* 358, 57-66

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.

Vidal E, Bolea R, Tortosa R, Costa C, Domènech A, Monleon E, Vargas A, Badiola J, Pumarola M (2006) Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains. *J Virol Meth* 36, 137-146

Vorberg I, Groschup MH, Pfaff E, Priola SA (2003) Multiple Amino Acid Residues within the Rabbit Prion Protein Inhibit Formation of Its Abnormal Isoform. *J. Virol.* 77, 2003-2009

Yenofsky R, Bergmann I, Brawerman G (1982) Messenger RNA Species Partially in a Repressed State in Mouse Sarcoma Ascites Cells. *PNAS* 79, 5876-5880

Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G (1983) Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1197-1203

Yow H, Wong JM, Chen HS, Lee C, Steele GD, Chen LB (1988) Increased mRNA Expression of a Laminin-Binding Protein in Human Colon Carcinoma: Complete Sequence of a Full-Length cDNA Encoding the Protein. PNAS 85, 6394-6398

Table 1. Genotypes detected for the insertion/deletion polymorphism (G) at position 29 of the ovine *RPSA* intron 4 which reflects the presence of a *RPSA* pseudogene.

(G)		SC infected	Healthy	Total
(+/+)	(+/-)	15	35	50
	Ψ			
	no Ψ	18	16	34
Total		33	51	84

Chi-square test: $\chi^2=4.465$ for the contingency table and $p\text{-value} = 0.035$ ($p<0.05$)

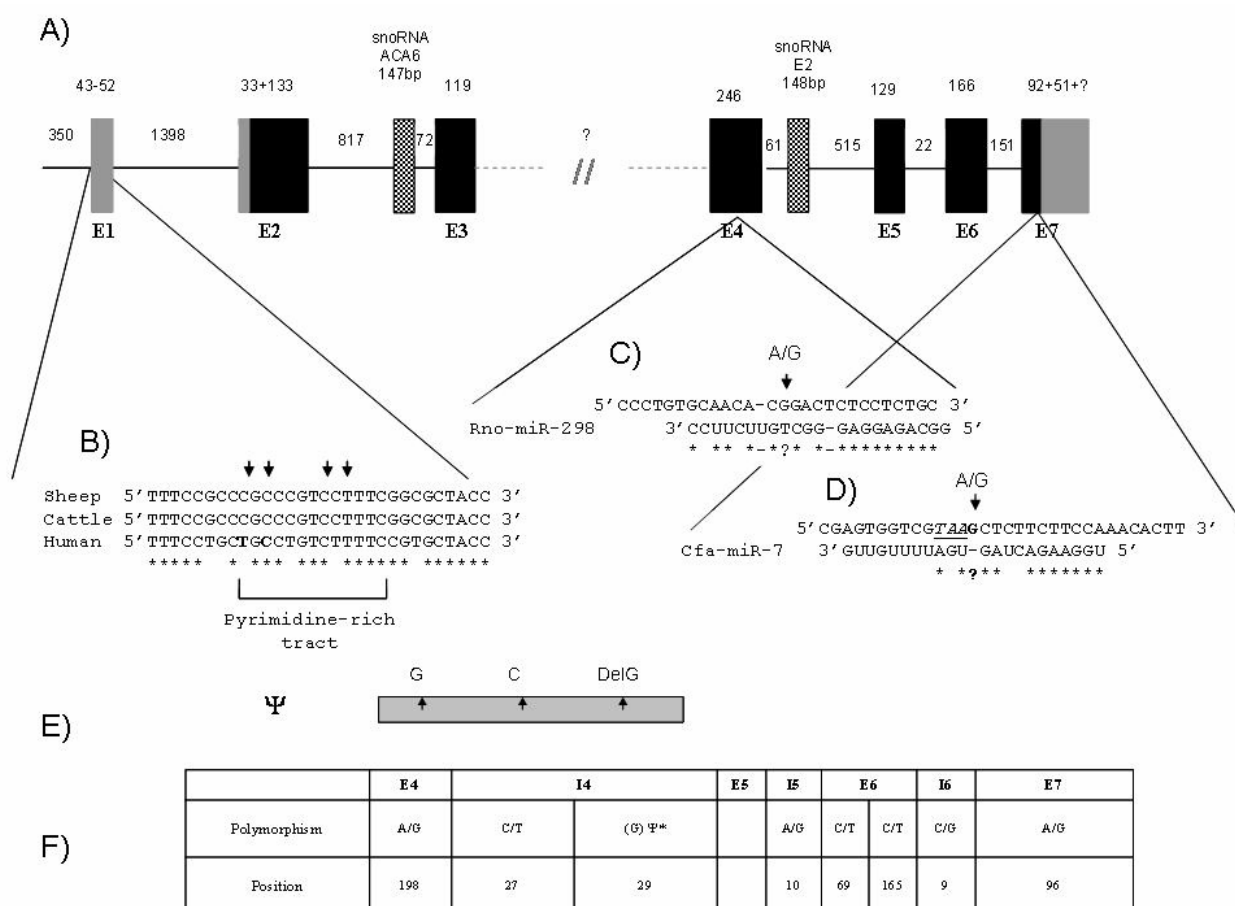


Fig.1. Characterization of the ovine *RPSA* gene. A) Schematic representation of the gene. Boxes represent the exons, (coding and non coding sequences in black and grey, respectively) and the two snoRNA (squared boxes) ACA6 and E2 in introns 2 and 4, respectively. Base pair composition is indicated above each exon, intron and snoRNA. Unsequenced regions (intron 3 and the 3'UTR) are indicated as ?. B) Alignment of the ovine and bovine *RPSA* regions matching with the polypyrimidine-rich tract (Mariottini and Amaldi 1990; Yenofsky et al. 1982; Yenofski et al. 1983) described in man (Jackers et al. 1996). Four possible transcription start sites are indicated with an arrow. C,D) alignment of the ovine *RPSA* exon 4 (C) and 7 (D) with two microRNAs predicted with the TargetScan program. (*) indicates the match between the microRNA and the putative target on the *RPSA* locus; and (?) positions affected by a mutation that could be involved in the binding of the microRNA. E) Partial putative sequence of the pseudogene co-amplifying when sequencing the region comprised between exon 4 and intron 4. The presence of a G, a C, and deletion of a G at locations corresponding to positions 198, 27, and 29 in *RPSA* exon 4 and intron 4 made genotyping of the animals difficult. F) Summary of the polymorphisms found between exons 4 and 7. Their positions within each exon and intron are also indicated. The insertion/deletion polymorphism (G) at position 29 in intron 4 reflects the presence/absence of a *RPSA* pseudogene (Ψ). In this case, the asterisk indicates that this polymorphism was significant ($p < 0.05$) in the association analysis.

B)

Co-factor	Sequence	Position	
		From	To
SP-1	GGGCAG	-227	-222
Common in RP	CTTTCG	-148	-143
Common in RP	CTTTCG	-106	-101
SP-1	AGGCCCGCCGCCA	-95	-83
SP-1	TGCAC	-79	-75
Common in RP	CTTTCG	-62	-57
CAAT	GTTTATTGCTTGA	-46	-31
TATA	CTATATAAGGCGTC	-24	-10
SP-1	CGGCCCGCCCGTC	-5	+8
AP2	TGGGGA	+121	+126
SP-1	CGGCCG	+182	+187
SP-1	GGGCAG	+249	+254
SP-1	TGCGC	+259	+263
MER	TGGCGCG	+328	+334
AP-1	TGACTGA	+341	+347
SP-1	TGCAC	+588	+592
SP-1	TGCAC	+746	+750
SP-1	GGGCA	+860	+873
SP-1	TGCAC	+1220	+1234

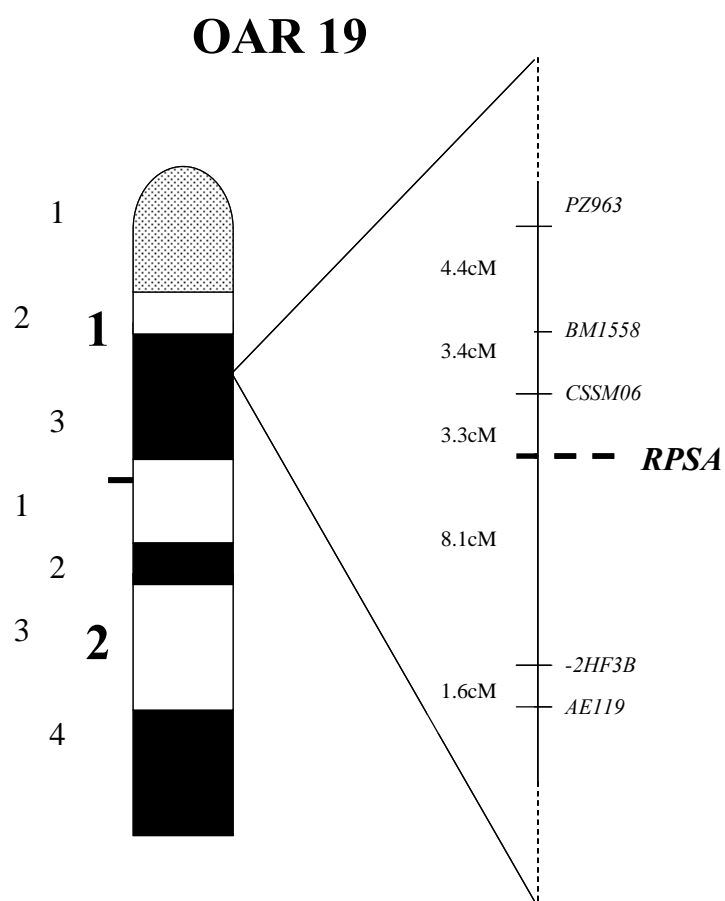


Fig. 3. Cytogenetic (left) and genetic (right) maps showing localization of the *RPSA* gene on sheep chromosome 19.

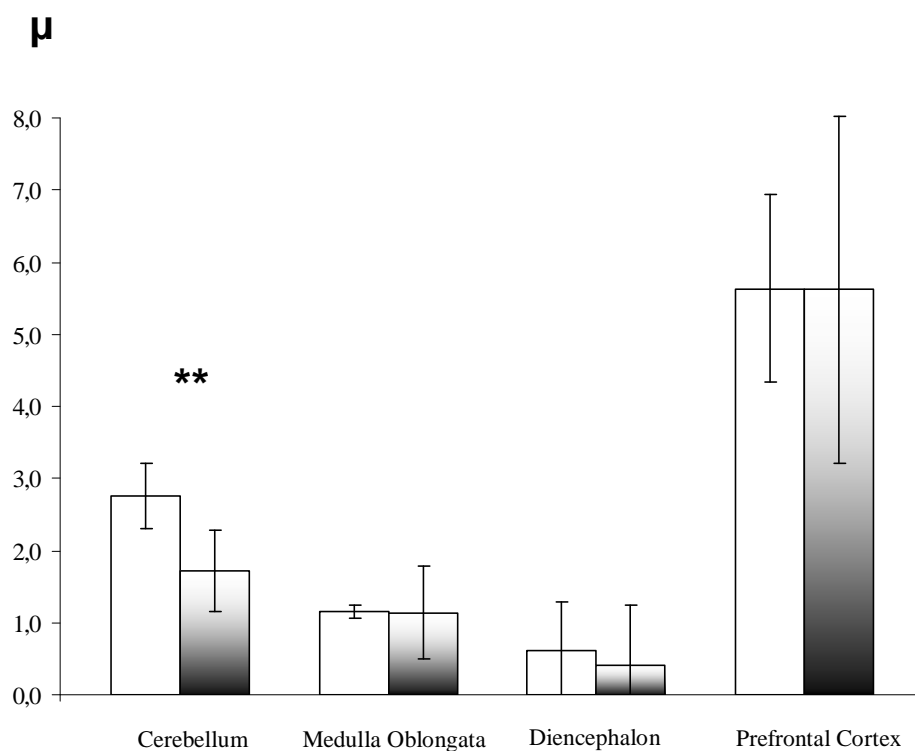


Fig. 4. Relative expression level (arbitrary units) in the brain regions analysed of five control (white) and eight scrapie-infected (black/grey) sheep. The mean (μ) and the standard deviation (bars) for normalised data are shown. (**) indicates significant differences ($p < 0.01$) in mRNA concentration between affected and healthy animals.

A)

```

Sheep      MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
cattle    MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Pig       MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Dog       MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Rabbit    -----IYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 23
Cat       MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Man       MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Mouse     MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Hamster   MSGALDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
Rat       MSGGLDVLQMKEDVLKFLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIYKRKSDGIYIINLKRTWEKLL 60
          □*****

Sheep      AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
cattle    AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Pig       AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Dog       AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Rabbit    AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 83
Cat       AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Man       AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Mouse     AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Hamster   AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
Rat       AARAIVAIEPNADVSISSRNTGQRAVLKFAAATGATPIAGRFTPGFTFNQIAAFREPR 120
          *****

Sheep      LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
cattle    LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Pig       LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Dog       LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Rabbit    LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 143
Cat       LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Man       LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Mouse     LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Hamster   LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
Rat       LLVVTDPRAHQPLTEASYVNLPTIALCNTDSPLYVDIAIPCNNKGAHSVGLMWMLAR 180
          *****

Sheep      EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
cattle    EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Pig       EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Dog       EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Rabbit    EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 203
Cat       EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Man       EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Mouse     EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Hamster   EVRRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
Rat       EVLRMRGTISRHPWEVMPDLYFYRDPPEIEKEEQAAAEKAVTKEEFQGEWTAPAPEFTA 240
          [*]*****

Sheep      AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
cattle    AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Pig       AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Dog       AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Rabbit    AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 258
Cat       AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Man       AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Mouse     AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Hamster   AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
Rat       AQPEVADWSEGVQVPSVPIQQFPTEDWSAQPTEDWSAAPTAAQATEWVGATTWES 295
          [*]*****

```

B)

	Specie	Accession number	Source	Position (aa)	
				241	272
Resistant to BSE and SC	Pig	NP_001032223.1	Protein	T	T
	Dog	NW_876276	Genomic DNA	T	A
	Rabbit	EF22437	cDNA	T	A
Resistant to SC	Man	P08865	Protein	T	A
Susceptible to BSE	Cat	Scaffold_214833	Genomic DNA	T	A
	Mouse	P14206 and NP_035159	Protein	A	A
	Hamster	P38982	Protein	A	A
Susceptible to BSE and SC	Rat	NP_058834.1	Protein	A	A
	Sheep	EF394773 and EF222474	Genomic DNA and cDNA	A	S
	Cattle	P26452	Protein	A	S

Fig. 5. Comparison of the LRP/LR amino-acid sequence among several mammalian species showing different levels of resistance to SC (Knorr *et al.* 2007; Lysek *et al.* 2005; Morel *et al.* 2005). A) Alignment of LRP/LR amino-acid sequences. Amino-acid differences among species are indicated as □. Arrows show amino-acid 243 and 249 that vary in mouse. Alanine, serine and threonine, which are variable at 241, 272 and 290 positions are highlighted in grey, black and squared, respectively. Other amino-acids that also vary in rat (aa 4), hamster (aa 183) and man (aa 293) are shown in bold letters. Highlighted in black and in a square are the direct (aa161 to 179) and the putative indirect (aa 180 to 285) binding domains of PrP on the LRP/LR (Hundt *et al.* 2001). B) A table summarising the different species compared, the accession numbers for the sequences used in the alignment and the origin of these sequences (cDNA, genomic DNA or protein sequence), the amino-acid composition at positions 241, 272 and 290 of the PrP, and the response of the different species to SC infection.

Appendix 1. List of primers used to amplify and sequence the ovine *RPSA* gene.

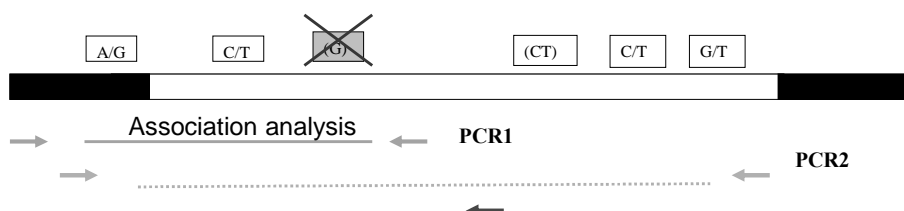
Primer localization	Foreward primer	Reverse primer	Amplicon size	Ta	Ext. time
(-420)-Intron1R	5'-TAACTTCTCCAGTTTTTGTGTT-3'	5'-CCTATGCAACACCTTGAAAAATCA-3'	1600	55	1'45"
Exon1-Intron2	5'-GGGGTCCATACGCGTGTG-3'	5'-TAGCTGGAATGACCAAGCAAAGAG-3'	1700	61	1'45"
Intron1	5'-TTACCGGAAAGATCAAACCTTCACG-3'	5'-CCTATGCAACACCTTGAAAAATCA-3'	800	55	1'
Intron1F-Intron2R	5'-TTACCGGAAAGATCAAACCTTCACG-3'	5'-TAGCTGGAATGACCAAGCAAAGAG-3'	1200	60	1'30"
Exon2-Exon3	5'-TTACGACCACTCGGTGGTGGTTC-3'	5'-GAAGCTTCTCCACGTCCTCTTG -3'	1200	50	45"
Exon2-Exon3	5'-GCAGCAGGAACCCACTTAGG-3'	5'-GACATCAGCCGGGTTTTCAAT-3'	200	60	30"
Intron2	5'-AGAGGGCTCTCACTAAGTAACTGA-3'	5'-TTCCATGCAGAATCCAAGAAG-3'	700	55	30"
Intron2-Exon3	5'-AGAGGGCTCTCACTAAGTAACTGA-3'	5'-GACATCAGCCGGGTTTTCAAT-3'	1000	57	1'30"
Intron2-Exon3	5'-AGCCTTAGAGGGCTCTCACT-3'	5'-GACATCAGCCGGGTTTTCAAT-3'	1000	60	1'
Exon4-Intron4	5'-CGAGCTGTGCTGAAGTTTGC-3'	5'-CAGCAGACTGTTAATTTGAAAGTG-3'	800	60	1'
Exon4-Intron4	5'-CTCCGGGAACCTTCACTAACCA-3'	5'-CAGCAGACTGTTAATTTGAAAGTG-3'	775	65	1'
Exon4-Intron4	5'-CGAGCTGTGCTGAAGTTTGC-3'	5'-GGCCTCAACTCCAAGCTCTA-3'	350	60	45"
Exon4-Intron6	5'-CGAGCTGTGCTGAAGTTTGC-3'	5'-CCCCGTCCCACCAATTTGC-3'	1500	51	1'30"
Intron4	5'-CTGGCCCAATGAGTGGAG-3'	5'-CAGCAGACTGTTAATTTGAAAGTG-3'	475	66	30"
Intron4-Exon7	5'-TGGGGGTGCGTATTACTGTT-3'	5'-GTTTATTTCCATCAACCA-3'	750	52	1'
Exon5-Exon6	5'-TACAGGGACCCCGAGGAG-3'	5'-CACCTGCACGCCTTCAGA -3'			

Appendix 2. List of primers and probes used for performing the RT-PCR

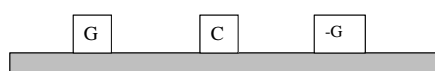
Gene	Primer and probes sequences	Concentration	Size
<i>RPSA</i>	F: 5'-CAGGGACCCCGAGGAGATT-3' R: 5'-CACCTGCACGCCTTCAGA-3'	300 nM 300 nM	151 pb
<i>G6PDH</i>	F: 5'-TGACCTATGGCAACCGATACAA-3'	300 nM	
(García-Crespo <i>et al.</i> 2005)	R: 5'-CCGCAAAAGACATCCAGGAT-3'	300 nM	76 pb
<i>GAPDH</i>	F: 5'-TCCATGACCACTTTGGCATCGT-3'	300 nM	
(Lyahyai <i>et al.</i> 2006)	R: 5'-GTCTTCTGGGTGCGAGTGA-3'	300 nM	
	P: FAM- AGGGACTTATGACCACTGTCCACGCC -TAMRA	150 nM	70 pb
<i>ACTB</i>	F: 5'-ATGCCTCCTGCACCACCA-3'	300 nM	
(García-Crespo <i>et al.</i> 2005)	R: 5'-GCATTTGCGGTGGACGAT-3'	300 nM	125 pb

|CGAGCTGTGCTGAAGTTTGC>^{F1}TGCTGCCACTGGAGCCACTCCTATCGCTGGCCGCTTCA|CTCCGGGAACCTTCACTAACCA>^{F2}GATCCAGGCCGCTTCAGGGAGCC
 GAGGCTTCTGGTGGTCACCGATCCCAGGGCTGACCACCAGCCCTCACGGAAGCCTCCTACGTTAACCTGCCAACCATTCCTGTGCAACACA//GGACTCTCCTCTGCGC
 TACGTGGACATCGCCATCCCGTGCAACAACAAGgtaacatccatgactgaactggcgcc/tggaccgtctgtgtccaccgcgggcgccttcc[tctgcacattgt^{r1}
 tagagcttggagttgagggc]actggccggtgaactcacaagtgtaggtagtggtgctacacgaggggcaagtttttcgctaaccaccacaaggggtctctggcccaatgagtg
 gagttggatagtaatacttctgtacaa]aagtatgatttttaaggagagatgaaaatatttttaaatagcctgtttttttctcttcaatattcctaactcttttcttaate
 atgtatcgtgctcgtgagatcctaaaaaggtgggttacgtgtggttcaaattgggtgttctgactgac^{sec}<tcaaacctggctacgcataa|gaacggggcagaggttt
 tcttttatttctaccagtatccaggca(ct)gaccccattttgttct/tggtagagtgaggtcttaattaacaccatgatttcgg/ttggcagacaagattaagaaccaga
 gatagagaacaatcttgggtgcaatcttgggttttgccttaattggagtagacgttttaagtgttgattgggtttctgctgtactaaa^{r2}<cactttcaaatcaacagtctgc
 ||tgacatggtaccaagggacctagacgatgaggggacaggtcggtggagtggggtgcgtattactgtttgggggttgcgaggggtcgcttgaaacctggtgctcttgacg

***RPSA* gene**
always present



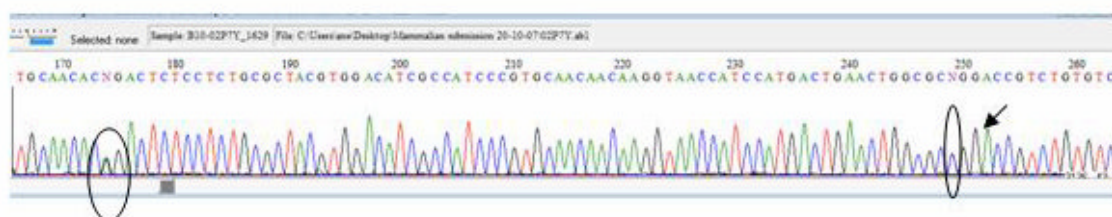
***RPSA* pseudogene**
not always present



	PCR1		PCR2	
Amplified Sequenced with Polymorphism Position	F1-R1 F1 E4 ₁₉₈ I4 ₂₇ I4 ₂₉	Sequence code	F2-R2 secR E4 ₁₉₈ I4 ₂₇ I4 ₂₉	Sequence code
Animal				
A	AG CT II	02P7Y	AG CT II	033ZQ
B	GG CT ID	02P7N	GG CT II	036IM
C	AG CT ID	02PU/	AG TT II	036I6

Appendix 3: Representation of the PCRs confirming the presence of a *RPSA* pseudogene coamplifying with the *RPSA* functional gene when performing the amplification reactions to test the polymorphisms located in exon 4 (capital bold letters) and intron 4 (lower-case) for the association analysis. Underlined and enclosed between [] is the snoRNA E2. Primers used are represented in grey. The polymorphisms found among this region are indicated in bold and underlined letters. The table summarises the primers used in the amplification and sequencing reactions as well as several animals whose genotypes, for the polymorphisms at positions 198 in exon 4 and 27 and 29 in intron 4, allowed us to infer the presence of a *RPSA* pseudogene which was not presented in all the animals analysed. The code of each sequence is also indicated. Thus, animal A did not bear the pseudogene, so results from both PCRs are consistent. Conversely, animals B and C bore the pseudogene, which was inferred by the Indel of a G (highlighted in grey) when performing the PCR1, but not when the PCR2 was carried out. In addition, animal B was heterocigotous for the SNP at position 29 in intron 4, while animal C was homocigotous (TT) for the same position. But, in the last case, the TT genotype was not possible to determine from the 02PU7 sequence which included the sequence of both, the functional gene and the pseudogene.

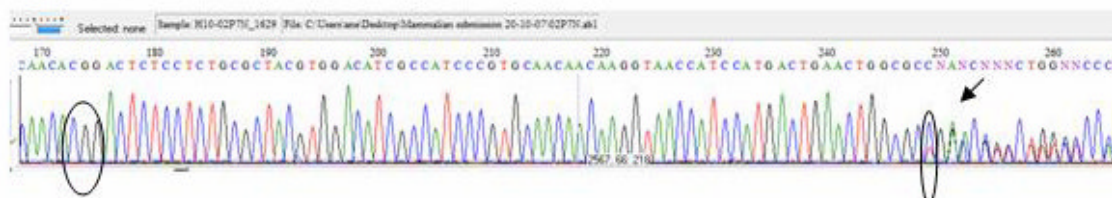
02P7Y



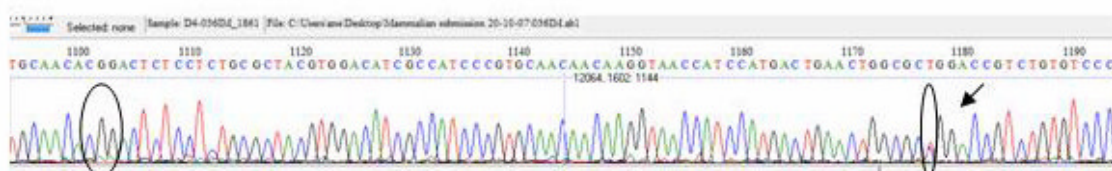
033ZQ



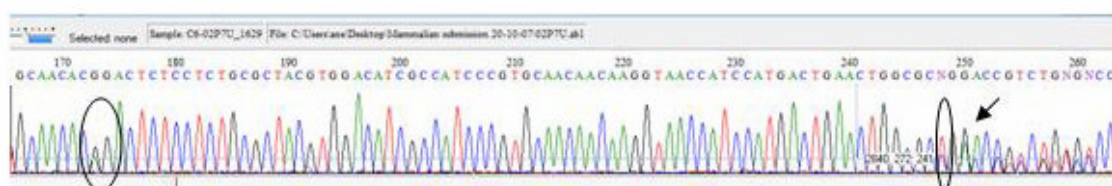
02P7N



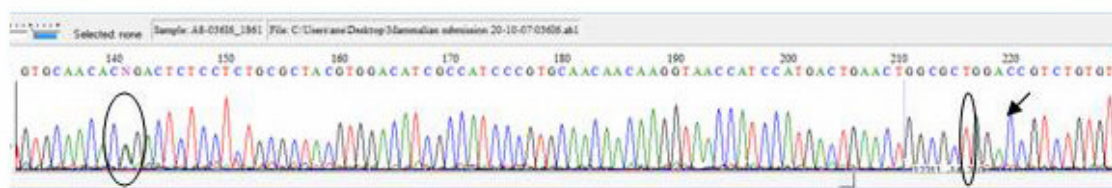
036IM



02P7U



036I6



VIII.5. POSTERS

Ane Marcos-Carcavilla¹, Jorge H. Calvo, Carmen González, Katayoun Moazami-Goudarzi, Pascal Laurent, Maud Bertaud, Hélène Hayes, Anne E. Beattie, Carmen Serrano, Jaber Lyahyai, Inmaculada Martín-burriel, Pilar Zaragoza, Juan J. Badiola, Estefania Alves and Magdalena Serrano. **Isolation, location and expression of two IL1 family members as possible candidate genes to scrapie in sheep.** ISAG2006. Porto Seguro (Brazil)

Ane Marcos-Carcavilla, Jorge H. Calvo, Carmen González, Katayoun Moazami-Goudarzi, Pascal Laurent, Maud Bertaud, Hélène Hayes, Anne E. Beattie, Carmen Serrano, Jaber Lyahyai., Inmaculada Martín-burriel and Magdalena Serrano. **Hsp90 α as part of the polygenic response to scrapie development in sheep.** Stress 2007. Budapest (Hungary).

Ane Marcos-Carcavilla¹, Jorge H. Calvo, Carmen González, Katayoun Moazami-Goudarzi, Pascal Laurent, Maud Bertaud, Hélène Hayes, Anne E. Beattie, Estefania Alves and Magdalena Serrano. **Ovine laminin receptor gene is not part of the Scrapie polygenic variance but, what about its role in the prion species barrier?.** Prion 2007. Edimburg (Scotland).



Isolation, location and expression of two IL1 family members as possible candidate genes to *scrapie* in sheep.

Ane Marcos-Carcavilla¹, Jorge H. Calvo², Carmen González¹, Katayoun Moazami-Goudarzi³, Pascal Laurent¹, Maud Bertaud¹, Hélène Hayes¹, Anne E. Beattie⁴, Carmen Serrano⁵, Jaber Lyahyai⁵, Inmaculada Martín-burriel⁵, Pilar Zaragoza⁵, Juan J. Badiola⁶, Estefania Alves¹ and Magdalena Serrano¹

¹ Departamento de Mejora Genética Animal-INIA, Madrid, Spain, ² Unidad de Tecnología en Producción Animal-CITA, Zaragoza, Spain, ³ Département de Génétique Animale-INRA, Jouy-en Josas, France, ⁴ AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Mosgiel, New Zealand, ⁵ Laboratorio de Genética Bioquímica-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ⁶ Centro Nacional de Referencia de EETS-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

INTRODUCTION

Scrapie (SC) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of sheep and goats. Susceptibility to this neurodegenerative disease is mainly controlled by point mutations at the *PRNP* locus. Other genes, apart from *PRNP*, have been reported to modulate resistance/susceptibility to SC. On the basis of several expression and quantitative trait loci (QTL) studies in Alzheimer and in different TSE models (Brown et al. 2003; Campbell et al. 1994, Kim et al. 1999; Williams et al. 1997; Lloyd et al. 2001; Lloyd et al. 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003a; Moreno et al. 2003b), and taking into account that the correct homeostasis of cytokines is crucial in the brain, *IL1B* and *IL1RN* were chosen as possible candidate genes contributing to ovine SC.

MATERIALS AND METHODS

GENE MAPPING

CYTOGENETIC MAPPING

Ovine *IL1B* and *IL1RN* genes were mapped using the ovine BAC library (Vaiman et al 1999) at INRA-CRJ and following the protocol described by Hayes and co-workers (1992) to perform the fluorescence in situ hybridisation on RBP-banded ovine chromosome preparations.

LINKAGE MAPPING

Both genes were mapped against markers on the sheep framework map (Maddox et al. 2001). Multipoint linkage analysis of the IMF pedigrees (Crawford et al. 1995) using the CRI-MAP program (Lander and Green 1987) was carried out.

EXPRESSION ANALYSIS

REAL TIME RT-PCR

Spleen and cerebellum tissue samples were obtained from eight naturally SC infected and five control sheep from the same breed, sex, age and *Prn-p* genotype (ARQ/ARQ). Gene expression levels were determined by Real Time RT-PCR.

RESULTS

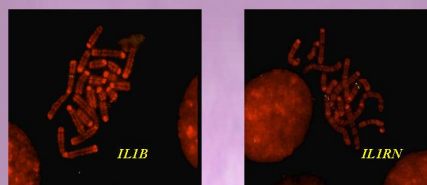


Figure 1. Cytogenetic mapping of *IL1B* and *IL1RN* genes on OAR3p22.

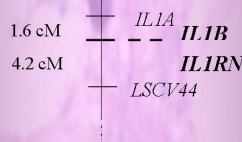


Figure 2. Linkage mapping of *IL1B* and *IL1RN* genes. *IL1B* and *IL1RN* mapped together (recombination fraction, $r = 0$), being between *IL1A* and *LSCV44* (two-point LOD score >3) markers in OAR3.

	QIL1BINF				QIL1RNF			
	Spleen		Cerebellum		Spleen		Cerebellum	
Animals	Affected	Healthy	Affected	Healthy	Affected	Healthy	Affected	Healthy
Average	0.1797	0.1891	0.1015	0.0428	0.4188	0.3688	0.0398	0.0178
S.D	0.1184	0.1101	0.0520	0.0110	0.1582	0.1311	0.0198	0.0075
Minimum	0.0334	0.0892	0.0495	0.0274	0.1470	0.2210	0.0190	0.0095
Maximum	0.4017	0.3611	0.1876	0.0527	0.5983	0.5441	0.0742	0.0294

Table 1. *IL1B* and *IL1RN* mRNA relative expression level (arbitrary units).
Q: mRNA quantity
NF: normalization factor (Van den sompele et al. 2002)

DISCUSSION

The localization of ovine *IL1B* and *IL1RN* genes on OAR3p22 is consistent with comparative mapping information since both genes map to bovine chromosome 11 (unpublished), human chromosome 2 and mouse chromosome 2. It should be noted that ovine chromosome 3 and mouse chromosome 2 have already been reported as chromosomes containing QTL regions involved in resistance/susceptibility and incubation period to SC and other TSEs (Lloyd et al. 2001; Lloyd et al. 2002; Manolakou et al. 2001; Moreno et al. 2003b) and that these genes are located within the proposed intervals.

No significant difference in the expression of *IL1B* and *IL1RN* between affected and healthy animals was found in the spleen ($p > 0.05$). Conversely, a significant increase ($p < 0.05$) of mRNA concentration was observed in cerebellum of SC infected sheep for *IL1B* ($t = -2.48$) and *IL1RN* ($t = -2.60$).

CONCLUSION

IL1B and *IL1RN* are good positional and functional candidate genes involved in the polygenic variance to ovine SC.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the CERSYRA-Valdepeñas, AGRAMA breeders associations, CSIC-León, CITA-Aragón, and INIA-Madrid for providing biological samples. We are very gratefully to Dr. EP Cribiu for allowing us performing the cytogenetic mapping in his laboratory.

REFERENCES

- Brown AR et al. (2003) *J Gen Virol* 84:2685-2611; Campbell IL et al. (1994) *J Virol* 68:2383-7; Diaz C et al. (2005) *J Gen Virol* 86:849-857; Hayes H et al. (1991) *Cytogenet Cell Genet* 57(1):53-5; Kim JI et al. (1999) *Brain Res Mol Brain Res* 73:17-27; Lander ES and Green P (1987) *10.1073/pnas.84.8.2363*; PNAS 84(8):2363-2367; Lloyd SE et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6279-83; Lloyd SE et al. (2002) *Neurogenetics* 4:77-81; Maddox JT et al. (2001) *Genome Res* 11(7):1275-1289; Manolakou K et al. (2001) *PNAS* 98:7462-7467; Moreno CR et al. (2003a) Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat, Toulouse, France, 8-11 december, Communication n° 2-27; Moreno CR et al. (2003b) *Genetics* 165:2085-91; Vaiman D et al. (1999) *Manum Genome* 10(6):585-7; Vandesompele J et al. (2002) *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034; Williams A et al. (1997) *Brain Res* 754:171-80.



Hsp90α as part of the polygenic response to scrapie development in sheep

Ane Marcos-Carcavilla¹, Jorge H. Calvo², Carmen González¹, Katayoun Moazami-Goudarzi³, Pascal Laurent⁴, Maud Bertaud⁵, Hélène Hayes³, Anne E. Beatie⁴, Carmen Serrano⁵, Jaber Lyahyai⁵, Inmaculada Martín-burriel⁶ and Magdalena Serrano¹

¹ Departamento de Mejora Genética Animal-INIA, Madrid, Spain, ² Unidad de Tecnología en Producción Animal-CITA, Zaragoza, Spain, ³ Département de Génétique Animales-INRA, Jouy-en-Josas, France, ⁴ AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Mosgiel, New Zealand, ⁵ Laboratorio de Genética Bioquímica-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ⁶ Centro Nacional de Referencia de EETS-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

INTRODUCTION

Scrapie (SC) is a prion disease affecting sheep and goats. This fatal neurodegenerative disease seems to be associated with events of protein misfolding which can overwhelm the ubiquitin-proteasoma system inducing apoptosis and increasing neuronal vulnerability to subsequent insults. Although susceptibility to SC is mainly controlled by point mutations at the *PRNP* locus, several studies argue in favour of other genes contributing to modulate resistance/susceptibility to this disease. On the basis of several studies in Alzheimer diseases (Evans et al 2006; Kakimura et al 2002), and taking into account the potential role that some chaperons could play in prion pathogenicity (Fig 1), *HSP90AA1* gene was chosen as possible candidate genes contributing to ovine SC.

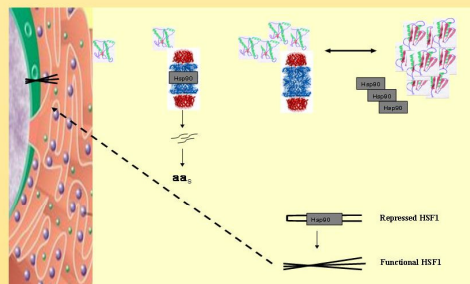


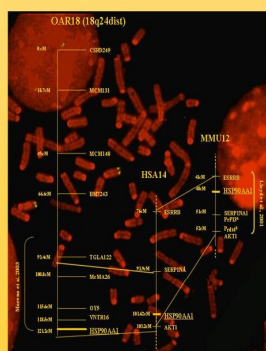
Fig 1. It can be hypothesized that, after SC infection, the aberrant and β -enriched isoform of the host encoded prion protein (PrP^{Sc}) starts to accumulate because its degradation is impaired. Hsp90 could contribute to the correct folding of PrP^{Sc} instead of participating in other functions (HSF1 repression and 26S proteasoma's functional integrity maintenance). It results in both an expression of other heat shock proteins, and a minor proteasomal function. Additionally, the endogenous PrP^{Sc} , which in normal circumstances is efficiently degraded by this machinery, would be accumulated in the cytoplasm, increasing the amount of substrate susceptible of being transformed to the PrP^{Sc} isoform.

WHAT DID WE DO?

1) OVINE *HSP90AA1* GENE ISOLATION AND CHARACTERIZATION

(GenBank accession number DQ983231)

2) MAPPING THE GENE

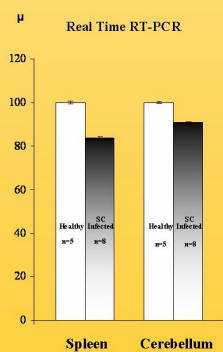


Ovine *HSP90AA1* corresponds with previously described QTL intervals for SC incubation period in sheep ()

* Prion Protein ligand 3

† prion disease incubation time 4

3) EXPRESSION ANALYSIS

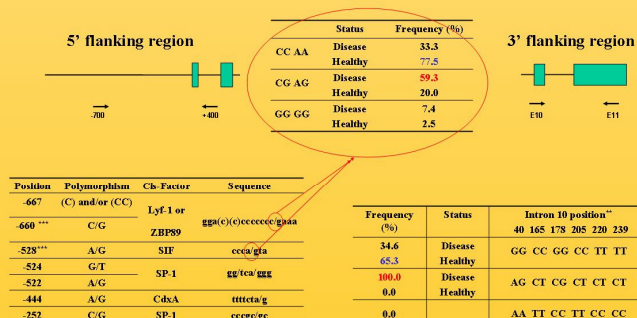


Breed: Rasa Aragonesa
PRNP genotype (*ARQ/ARQ*)
n=13

No differences were detected.

4) ASSOCIATION ANALYSIS

Regions containing possible transcriptional and posttranscriptional regulatory elements, which were predicted by homology comparison and *in silico* prediction, were analysed in a sample of 80 Rasa Aragonesa breed sheep that despite having the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*) displayed different responses to SC infection.



Significant association was found for the substitution at -660 and -528 position in the 5' flanking region ($p < 0.001$) and for the six linked SNPs at intron 10 ($p < 0.01$). These substitutions could affect the transcriptional efficiency (Yamada et al. 2001) and the mRNA 3' end formation (Nesic and Maquat, 1994), respectively.

CONCLUSION

HSP90AA1 is a good positional and functional candidate gene modulating SC incubation period in sheep. Thus, the GG and the ATCTCC alleles, at positions -660 and -528 in the 5' flanking region, and 40, 165, 18, 205, 220, and 239 in *HSP90AA1* intron 10 seem to be associated with higher susceptibility to SC

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the CERSYRA-Valdepeñas and AGRAMA breeders association, CSIC-León, CITA-Aragón, Prion Research Centre of the University of Zaragoza - and INIA-Madrid for kindly providing animal samples. We are very grateful to Dr. E.P. Cnbiu and Dr. P. Zaragoza for allowing us to perform the cytogenetic mapping and the expression analysis in their respective laboratories. This work was supported by the RTA2006-00104 INIA project, and a Predoctoral Grant from the INIA.

Ovine laminin receptor gene is not part of the Scrapie polygenic variance but, what about its role in the prion species barrier?

Marcos-Carcavilla A¹, Calvo JH², González C¹, Moazami-Goudarzi K³, Laurent P³, Bertaud M³, Hayes H³, Beattie AE⁴, Alves E¹ and Serrano M¹

¹ INIA, Madrid, Spain, ² CITA, Zaragoza, Spain, ³ INRA, Jouy-en-Josas, France, ⁴ AgResearch, Invermay Agricultural Centre, Mosgiel, New Zealand.

E-mail: amarcos@inia.es

INTRODUCTION

The existence of other genes, apart from the *PRNP*, have been proposed to explain both different incubation periods to scrapie and the species barrier. In this regard, it has been demonstrated the implication of the laminin receptor (LRP/LR), with the aid of heparan sulphate proteoglycans as cofactors/co-receptors, not only in PrP^C metabolism, but also in prion propagation (Adjou et al. 2003; Gauczynski et al. 2001; Horonchik et al. 2005; Hundt et al. 2001; Leuch et al. 2003; Morel et al. 2005; Rieger et al. 1997; Vana and Weiss, 2006).

OBJECTIVES

- Isolate, characterize and map the ovine LRP/LR gene (*RPSA*).
- Evaluation of the LRP/LR relevance in the polygenic variance described above and in several TSEs species barrier.

MATERIALS AND METHODS

GENE MAPPING Ovine *RPSA* gene was both cytogenetically and genetically mapped.

GENE ISOLATION AND CHARACTERIZATION Ovine *LAMRI* gene was isolated and sequence using mRNA, genomic and BAC DNA.

ASSOCIATION ANALYSIS

The polymorphism of the ovine LRP/LR at described binding domains to PrP (Hundt et al., 2001) was studied in 80 Rasa Aragonesa breed sheep that, despite having the same *PRNP* genotype (*ARQ/ARQ*), showed different response to SC infection.

INTERSPECIES COMPARISON

Finally, LRP/LR protein sequences from several mammals displaying different response to prion infection (Knorr et al., 2007; Lysek et al. 2005; Morel et al. 2005) were compared.

RESULTS



Fig1. Ovine *RPSA* gene organization (GenBank EF394773).

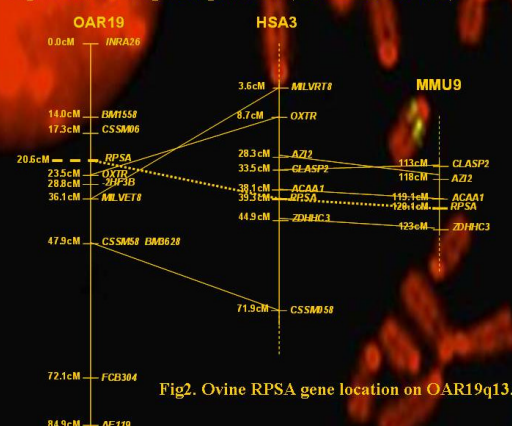


Fig2. Ovine *RPSA* gene location on OAR19q13.

No amino acid change was found at the binding domains to PrP on ovine LRP/LR

Sheep	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Cattle	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Pig	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Dog	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Rabbit	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Man	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
House	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Hamster	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Rat	MSGLDIVLQREEDVVKLALGTHLGGTHLDFQWQYTYWQSSNGVYTLAKRTVERLLAAATVLEHPADSVLSMRTGQAVLRFARATGTFIAGRTTPTGTHQIQAREPR	120
Sheep	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Cattle	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Pig	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Dog	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Rabbit	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Man	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
House	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Hamster	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Rat	LLVVDVPRADHPTLTCVSVLPTLHCHTSPLQVDTLPCNCHGASVLAHMLADGVLLHGGTISREHPVHPVLPVYVDPPEETKEDQAAKCAVTEKEEGQGVTAPEPTA	240
Sheep	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Cattle	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Pig	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Dog	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Rabbit	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Man	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
House	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Hamster	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255
Rat	RQPVADNSGVSVVQVPTQPTEDSAGPTEDNSAMPVQATATVQVTTEDNS	255

Fig3. LRP/LR sequence comparison. The direct (aa161-179) and indirect (aa180-285) binding domains to PrP are highlighted in yellow and blue, respectively.

DISCUSSION

Ovine *RPSA* gene is organised in seven exons and six introns and bears two snoRNAs on introns 2 and 4.

The localization of *RPSA* on OAR19 is consistent with comparative mapping information.

CONCLUSION

Although our results discard LRP/LR as responsible for the different susceptibility between sheep with the same *PRNP* genotype, its possible involvement in SC and other TSEs species barrier shouldn't be ruled out.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank the CERSYRA-Valdepeñas and AGRAMA breeders association, CSIC-León, CITA-Aragón, Prion Research Centre of the University of Zaragoza, and INIA-Madrid for kindly providing animal samples. We are very grateful to Dr. J.M. Torres for his suggestions concerning the species barrier, and to Dr. E.P. Cribiu for allowing us to perform the cytogenetic mapping in his laboratory. This work was supported by the RTA2006-00104 INIA project, and a Predoctoral Grant from the INIA.

* Sequences isolated in the present work.

IX. GLOSARIO

Amiloidosis

Término genérico, utilizado para hacer referencia a un grupo de enfermedades de etiología diversa y pronóstico y tratamiento variables. Todas ellas están causadas por el depósito extracelular de material amiloide. Éste se caracteriza por ser de naturaleza proteica, insoluble y resistente a la proteólisis. La afinidad de este material por los colorantes yodados es lo que da origen a su nombre.

Apoptosis

Programa de muerte celular, controlado genéticamente, que se activa como parte del desarrollo normal o como consecuencia de un daño celular.

Astrocito

Célula glial abundante en cerebro y médula espinal. Su morfología (como indica su nombre) recuerda a una estrella por la gran cantidad de prolongaciones que irradian desde el soma hacia las células vecinas. La principal tarea de los astrocitos es unir las neuronas a los capilares sanguíneos, así como mantener la homeostasis entre el medio extracelular y el intracelular. Además, participan en los procesos de regeneración de lesiones en el SN, aumentando su tamaño y enviando sus proyecciones para rellenar la zona dañada. Los astrocitos cumplen la función de sostén mecánico, facilitan la migración de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso y modulan la comunicación neuronal.

Astrogliosis

Hipertrofia y proliferación de la astroglia.

BAC

Vector usado para clonar fragmentos de ADN (de 100 a 300 kb de tamaño) en *Escherichia coli*, basado en el plásmido factor-F encontrado de modo natural en esta bacteria. Es uno de los tipos de vectores de clonación conocidos como "vectores de alta capacidad". Los BACs son muy utilizados como vectores de clonación para la construcción de genotecas genómicas ya que son muy estables y tienen bajo porcentaje de quimerismo.

Caveola

Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana (de 50 a 100 nm de diámetro) que se consideran un subtipo de *raft* (véase definición de raft). Estas invaginaciones de la membrana se mantienen estructural y morfológicamente gracias a una familia de proteínas, las caveolinas. En estos microdominios de la membrana plasmática se segregan diferentes tipos de proteínas, muchas de las cuales están involucradas en la transducción de señales.

Chaperona

Las chaperonas son un conjunto de proteínas cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién sintetizadas. Están presentes en todas las células y muchas de ellas son proteínas de choque térmico. Las chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular. Actualmente se sabe que las chaperonas no sólo se encargan de velar por la correcta conformación de las proteínas, sino que también son importantes elementos a la hora de promover la comunicación entre distintas redes de señalización, en la estabilización de las membranas, el mantenimiento de la homeostasis redox, la protección de la integridad del ADN en condiciones de estrés ambiental y la regulación de redes de transcripción.

Citoquina

Las citoquinas son proteínas encargadas de la comunicación intercelular, activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas, fundamentalmente, por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polinucleares, células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos) o interleuquinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación. Hay citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Comunicación paracrina

Comunicación a nivel local que se produce entre células que se encuentran relativamente cercanas, sin que para ello exista una estructura especializada.

Comunicación autocrina

La comunicación autocrina o autocomunicación es la que establece una célula consigo misma.

Comunicación yuxtacrina

Es la comunicación por contacto con otras células o con la matriz extracelular, mediante moléculas de adhesión celular. La comunicación yuxtacrina se realiza entre otros mecanismos por medio de las uniones celulares como las uniones *gap*.

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas y altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares, lo que lleva a una situación conocida como estrés oxidativo.

Espongiosis

Anormalidad histológica consiste en la aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma de las células.

Estrés oxidativo

Alteración del equilibrio prooxidante-antioxidante en favor del primero, cuyas consecuencias pueden ser bases de ADN dañadas, productos de oxidación de las proteínas, y la peroxidación de lípidos, entre otras.

Glía

Término procedente del término griego " glia " que significa pegamento, para designar el tejido nervioso constituido por células que no participan en la transmisión del impulso nervioso. También se denomina neuroglía. Se considera tejido de sostén, aunque también ayuda a mantener la capacidad de transmisión de las neuronas. Está constituido por astrocitos, oligodendrocitos y células de la microglía

Gliosis

Proceso por el cual los astrocitos rellenan los huecos generados por los macrófagos tras la fagocitosis de las neuronas muertas en áreas lesionadas.

Microglía

Célula glial pequeña que tiene capacidad fagocitaria. Las células microgliales representan el sistema mononuclear fagocítico en el sistema nervioso central. Contienen lisosomas y cuerpos residuales. Este tipo celular tiene la capacidad de redondearse y transformarse en corpúsculos granulosos que emigran por sus movimientos ameboides con la carga pesada. Cuando la microglía está en este estado se dice que está activada.

Péptido señal

Señal intrínseca que poseen las proteínas recién sintetizadas y que debe ser descifrada en los lugares de destino. La señal consiste en un péptido hidrofóbico, el péptido señal, constituido por unos 20 aminoácidos en orden particular, que son los primeros que aparecen cuando se está sintetizando la cadena polipeptídica. Este péptido parece que señala a la célula que la proteína a la cual está unido debe ser transportada.

Peroxidación de lípidos

Degradación oxidativa de lípidos. Es el proceso por el que los radicales libres “roban” electrones de los lípidos de las membranas produciendo daño en las células. Las consecuencias fundamentales de la peroxidación de lípidos son la distorsión y/o ruptura de la membrana y la toxicidad de los peróxidos lipídicos y sus productos de ruptura.

Proteosoma

Complejo proteico que se encarga de realizar la degradación de proteínas no necesarias o dañadas. Las proteínas a ser degradadas son marcadas por varias moléculas de una proteína llamada ubiquitina. Estructuralmente un proteosoma es un complejo con forma de barril que contiene un "núcleo" compuesto de cuatro anillos apilados alrededor de un poro central. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas β , conformando los sitios activos de las proteasas. Estos sitios se encuentran en las caras internas de los anillos, de manera que la proteína a degradarse tiene que entrar al poro antes de ser procesada. Los dos anillos exteriores contienen subunidades α , cuya función es mantener una "puerta" por la cual las proteínas puedan

entrar al barril. Las subunidades α son controladas por partículas reguladoras, a veces llamadas "pestañas", que reconocen los compuestos poliubiquitinados e inician el proceso de degradación.

Pseudogén

Secuencia nucleotídica similar a un gen normal pero que no se traduce y que puede o no transcribirse, pudiendo o no ser funcional. Se han propuesto varios escenarios para explicar el origen de un pseudogen:

1- Fragmentos de la transcripción en ARNm de un gen pueden ser transcritos inversamente de manera espontánea e insertados en el ADN cromosómico por un proceso llamado retrotransposición. A estos pseudogenes se les llama procesados y, como carecen de los promotores de los genes normales, no se expresan con normalidad.

2- Un suceso de duplicación genética puede provocar que un genoma tenga dos copias de un gen cuando sólo necesita de una. Las mutaciones que desactiven una de las copias no serían, por tanto, seleccionadas en contra (e incluso podrían tener cierta ventaja selectiva estando desactivados). Además, el suceso de duplicación puede no ser completo, de manera que la copia no incluya todo el gen. Estos pseudogenes se llaman duplicados o sin procesar.

3- Un gen puede dejar de ser funcional o desactivarse si una mutación, que lo inactiva, así se fija en la población.

Raft

Los *rafts* son microdominios de membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y de esfingolípidos y que se aíslan por ultracentrifugación como una fracción de baja densidad

Resonancia magnética nuclear

Técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos. La resonancia magnética hace uso de las propiedades de resonancia aplicando radiofrecuencias a los átomos o dipolos entre los campos alineados de la muestra y permite estudiar la información estructural o química de ésta.

Splicing alternativo

Reacciones de corte y empalme que tienen lugar durante el procesamiento del pre-ARNm para eliminar los intrones.

Vacuolización

Proceso de formación de vacuolas que tiene lugar en los procesos de degeneración celular

El *scrapie* es una encefalopatía espongiforme transmisible que afecta a las especies ovina y caprina. La susceptibilidad genética a esta enfermedad neurodegenerativa parece estar controlada por el efecto conjunto de mutaciones puntuales en el gen *PRNP* y un número indeterminado de genes (poligen) que modularían su efecto. En el presente trabajo se analizan los genes ovinos *RPSA*, *HSP90AA1*, *IL1B* e *IL1RN* como posibles candidatos funcionales y/o posicionales involucrados en la modulación de la respuesta a *scrapie* en la especie ovina.

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy affecting sheep and goats. Genetic susceptibility to this neurodegenerative disease is mainly controlled by point mutations at the PRNP locus and by an undetermined number of genes (polygene) modulating its effect. In the present work, the ovine RPSA, HSP90AA1, IL1B and IL1RN, are studied as possible functional and/or positional candidate genes involved in the modulation of the different response to scrapie infection in sheep.

